



TITLE:

# インビトロでのゴルジ体の膜融合活性の解析( Dissertation\_全文 )

AUTHOR(S):

鍵和田, 聡

---

CITATION:

鍵和田, 聡. インビトロでのゴルジ体の膜融合活性の解析. 京都大学, 1993, 博士(理学)

ISSUE DATE:

1993-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3066144>

RIGHT:



新 制
理
817
京大附図

# 学位申請論文

鍵和田 聡



学位申請論文

インビトロでのゴルジ体の膜融合活性の解析

京都大学理学部理学研究科  
生物物理学専攻  
量子生物学講座

鍵和田 聡

# 目次

略語表	4
1.序論	6
1-1. 細胞間の膜融合	9
1-1.A エンベロープウイルスの膜融合	9
1-1.B 受精	15
1-2. 細胞内の膜融合	16
1-2.A ゴルジ体間小胞輸送	16
1-2.B エンドソーム融合	21
1-2.C エキソサイトーシス	22
1-3. リポソームの膜融合	24
1-3.A リポソームを使った膜融合の解析法	24
1-3.B リポソームと生体膜との融合	27
1-4. 本研究の目的と結果の要旨	29
2.実験方法	31
2-1. 使用した溶液の組成	32
2-2. リポソーム調製法	32
2-3. ゴルジ体膜の調製	34
2-4. 形質膜 粗面小胞体膜 滑面小胞体膜の調製	34
2-5. 電子顕微鏡観察用試料の作成	36
2-6. 細胞の培養	36
2-7. モノクローナル抗体の作製	37
2-8. 間接蛍光抗体法	37
2-9. ゴルジ体膜の免疫沈降	38
2-10. 膜融合測定	38
2-11. ゴルジ体膜の処理	39
2-12. 会合測定	40
2-13. 酵素活性測定	41
2-14. その他	42



3.結果	43
3-1. 単離したゴルジ体膜の酵素活性	44
3-2. HRP封入LUVとゴルジ体膜の融合	46
3-3. ゴルジ体特異的モノクローナル抗体によるゴルジ体膜の単離	49
3-4. 脂質混合法によるゴルジ体膜とリポソームとの融合	51
3-5. SUVと他の膜分画との融合	56
3-6. 内水相混合法によるゴルジ体膜とリポソームとの融合	60
3-7. ゴルジ体膜とリポソームとの融合に影響を及ぼす因子	63
3-8. ゴルジ体膜とSUVの会合量の測定	70
3-9. 脂質組成	76
3-10. モノクローナル抗体C6A3の性質	78
4.考察	80
4-1. 本研究で使用したゴルジ体膜の性質	81
4-2. ゴルジ体膜とリポソームの膜融合を制御する因子	82
4-3. セミインタクト細胞でのゴルジ体とリポソーム融合との比較	87
4-4. ゴルジ体膜とリポソームとの融合と生体機能との関連	88
5.謝辞	92
6.参考文献	94

略語表(図表のみに使用したものは除いた)

ANTS: 1-aminonaphthalene-3,6,8-trisulfonic acid  
CGN: cis Golgi network  
CHO: chinese hamster ovary  
Con A: concanavaline A  
DAB: diaminobenzidine  
DOPC: dioleoylphosphatidylcholine  
DTT: dithiothreitol  
EDTA: ethylenediamine tetra acetic acid  
EGTA: ethyleneglycol bis(2-aminoethyl ether)tetraacetic acid  
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay  
FITC: fluorescein isothiocyanate  
GTP $\gamma$ S: guanosine 5'-O-(thio)triphosphate  
GUV: giant unilamellar vesicles  
Hepes: N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid  
HRP: horseradish peroxidase  
IgG: immunoglobulin G  
kDa: kilodalton  
LUV: large unilamellar vesicles  
NBD: 7-nitrobenzyl-2-oxa-1,3-diazol-4-yl  
NEM: N-ethylmaleimide  
NRK: normal rat kidney  
NSF: NEM sensitive fusion protein  
PBS: phosphate-buffered saline  
PC: phosphatidylcholine  
PE: phosphatidylcholine  
Pipes: 1,4-piperazinediethanesulfonic acid  
PNS: postnuclear supernatant  
PS: phosphatidylserine  
R18: octadecylrhodamine B  
Rh: rhodamine  
rpm: round per minute

ST: sucrose + 10 mM Tris-HCl, pH 7.4

SUV: small unilamellar vesicles

TGN: trans Golgi network

Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane

VSV: vesicular stomatitis virus

WGA: wheat germ agglutinin



## 1. 序論

生体膜は、その内容物を外界から区別する。膜に囲まれて、他と区別されるのは、その区画の中で行われる営みが、外の世界からの干渉を受けてはならないからである。たとえば、細胞内には、タンパク質分解酵素や生体に有害な過酸化水素合成酵素が含まれているが、これらは、細胞質タンパク質と無差別に反応しないように細胞内小器官であるリソソームやペルオキシソームに隔離されている。ゴルジ体や小胞体で行うタンパク質の糖鎖修飾も、膜内で効率的に、順序立てて行われる。つまり、その役割を考えると、本来、膜は融合してはならないものであり、この原則が崩されるのは、受精における種の多様性の創造のように、個体(種)に利益をもたらすときである。したがって、生体には、膜融合を制御する巧妙な機構が存在するはずであり、その分子機構の解明は生物学の基本的な課題のひとつである。

本論では、まず、生体内で見られる膜融合現象を、研究方法や膜融合モデル、これまでにわかってきた制御因子(特にタンパク質を中心に)について説明する。生体内の膜融合は、細胞間(または細胞とウイルス間)で行われる膜融合と、細胞内で行われる膜融合に分けられる。細胞間の膜融合は、膜を構成する脂質二重層のうち、細胞外に面した層を形成する膜同士との融合である。細胞内の膜融合は、細胞質側に面した層を形成する膜同士との融合である[Stegman et al., 1989a; White, 1990, 1992]。各タイプの膜融合に、それぞれ共通した分子機構が存在すると考えられているので、細胞間と細胞内の二つに分けて説明する。つぎに、生体膜のモデルとして使われてきたリポソームの性質と膜融合解析への応用について述べる。最後に、本研究の目的と結果の要旨について記す。

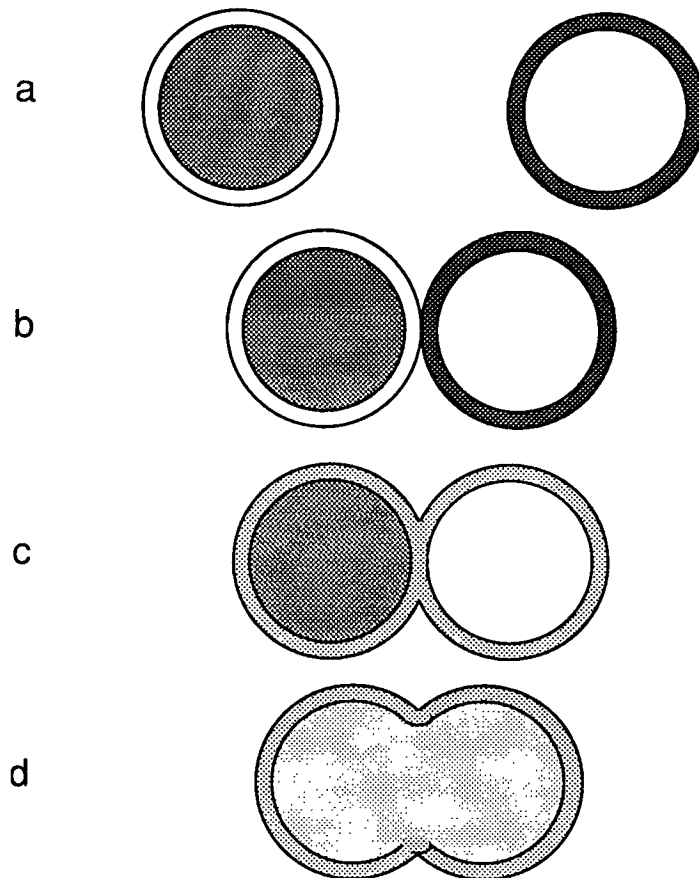


図1-1 膜融合の素過程。

膜融合は、つぎにあげる過程の集合と考えられる。

1. 「会合」：膜の会合 凝集(b)
2. 「脂質混合」・膜の構成要素(脂質やタンパク質)の混合(c)
3. 「内水相混合」 膜の内水相(膜内の水溶性の領域)の混合(d)

膜融合に伴う膜構造の大規模な変化を考慮すれば、上記の過程はさらに細かく分けられる。膜融合の分子機構の解明とは、これらの過程を制御する因子を明らかにすることである。



## 1-1 細胞間の膜融合

### 1-1.A エンベロープウイルスの細胞内侵入

エンベロープウイルスは、ゲノムや自己の複製に必要なタンパク質を膜で包んだウイルスの総称である。エンベロープウイルスが、これらの構成要素を細胞内へと移行させるには、宿主細胞の形質膜と融合するか、エンドサイトーシスによって宿主細胞に取り込まれた後、エンドソーム膜と融合しなければならない(図1-2)。形質膜と融合するウイルスは、中性でも膜融合活性を発現する。このタイプには、センダイウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、ラウス肉腫ウイルスなどがある。エンドソーム膜と融合するウイルスは、酸性でのみ膜融合活性を発現する。これは、エンドソーム膜に存在するプロトン輸送性 ATPアーゼによって、エンドソーム内部が酸性になっているためである。このタイプのウイルスには、インフルエンザウイルス、セムリキ森林ウイルス、水疱性口内炎ウイルス、マウス乳癌ウイルスなどがある。ただし、中性で膜融合活性を発現するウイルスのなかには、エンドソームと融合する可能性があるものもあり、この区別は厳密ではない。

以降、これらのエンベロープウイルスのなかで、膜融合の分子機構に関する研究がもっとも進んでいるインフルエンザウイルスについて述べる [Ohnishi, 1988; Stegmann et al., 1989a; White, 1990]。

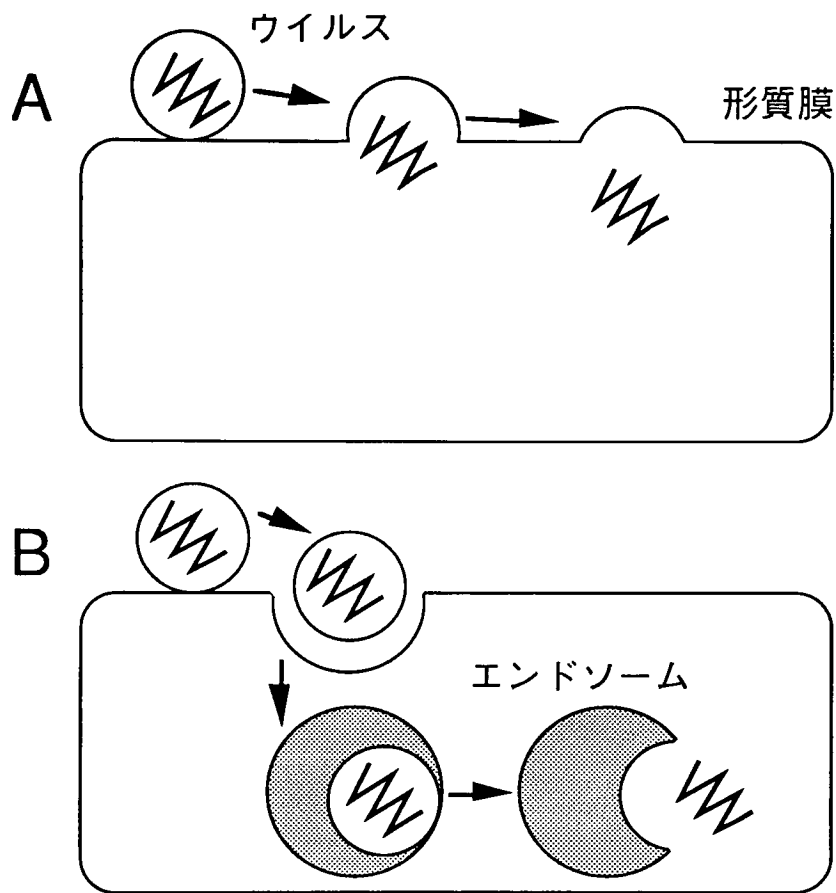


図1-2 エンベロープウイルスの細胞内侵入の経路。

エンベロープウイルスは、形質膜(A)またはエンドソーム膜(B)と融合することで、細胞内にゲノムを移行させる。どちらの経路をとるかは、ウイルスの膜融合活性のpH依存性によると考えられている。

インフルエンザウイルスの膜融合活性を担うのは、ヘマグルチニンと呼ばれる分子量 84kDaの膜タンパク質である。これは、培養細胞の形質膜に発現させたヘマグルチニンがpH 依存的膜融合活性を示したことから明らかになった[White et al., 1982a]。ヘマグルチニンは小胞体で合成されると三量体を形成し、形質膜に運ばれる途中で加水分解を受け、アミノ末端側のHA1とカルボキシル末端側のHA2サブユニットに分れる [Copeland et al., 1986, 1988]。この加水分解は膜融合活性の発現に必須である [Klenk et al., 1975]。

インフルエンザウイルスの誘起する膜融合の研究は、ウイルス自身やリポソームに再構成したウイルスと、リポソームの膜融合を測定することを中心に行われてきた。その結果、つぎのような知見が得られている。融合にはカルシウムやマグネシウムイオンは必要でない [Stegmann et al., 1986; White et al., 1982b]。一度酸性にさらされたウイルスは融合活性を失う [White et al., 1982b]。膜融合は迅速に起こり、37℃の測定では約 2分以内で完了する [Maeda et al., 1981; Stegmann et al., 1989b]。融合には複数のヘマグルチニン三量体が関与し、三量体の三次構造の変化を伴う [Godley et al., 1992]。

ヘマグルチニンには膜融合活性のほかに、シアル酸との結合活性がある。結合活性に関与する部分はヘマグルチニンの頭部(膜から遠い部分)にあり、融合活性に関与する部分とは独立している。リポソーム膜中にシアル酸を含ませることは、融合に必須ではないが、ウイルスとリポソームの会合速度を増大させる [Stegmann et al., 1989b]。生体内では、シアル酸は、ウイルスが標的膜を認識するための重要な役割をすると考えられている。

膜融合活性は、HA2サブユニットのN末端側に存在する、疎水性アミノ酸約20残基からなる「融合ペプチド」部位によると考えられている。「融合ペプチド」はインフルエンザウイルスのさまざまな株の間で保存的に存在し、他のウイルスの膜融合タンパク質にも見いだすことができる。「融合ペプチド」が膜融合に関与することは、部位特異的変異法で、ヘマグルチニンのアミノ末端(すなわち、「融合ペプチド」のアミノ末端)のグリシンをグルタミン酸に置換すると、膜融合活性のpH依存性に変化を与えることから示された [Gething et al., 1986]。また、「融合ペプチド」部位と同じ一次構造を持つペプチドを合成したところ酸性で膜融合活性を発現したことから、ヘマグルチニンのpH依存的膜融合活性は「融合ペプチド」の性質によること



が示唆された[Murata et al., 1987 1991a,b, 1992a]。

ウイルスと標的膜との結合後、酸性でのヘマグルチニンの構造変化にともない、「融合ペプチド」が外部に露出し、ヘマグルチニンと標的膜との相互作用を促進し、膜融合を引き起こすというモデルが提唱されている(図1-3)。この場合に「融合ペプチド」が標的膜とどのように相互作用するかで、モデルが二つある。ひとつは、「融合ペプチド」が、ウイルス膜上で会合したヘマグルチニン三量体の内部に露出すると考える説[Bentz et al., 1990]。もうひとつは、「融合ペプチド」が相対する膜それぞれに結合し、両者を引きつけるとする説である[Stegmann et al., 1990]。いまのところ、どちらの説も実証されていない。ただ、両モデルとも、融合する膜の間に「融合孔(fusion pore)」が形成されるという概念を中核としているところは、エキソサイトーシスでの膜融合モデルと関連して注目されている。

その他のウイルスの膜融合活性タンパク質と、その特徴を表(1-1)にまとめた。いずれのタンパク質も膜タンパク質であり、結合と融合活性を合わせ持つものが多い。

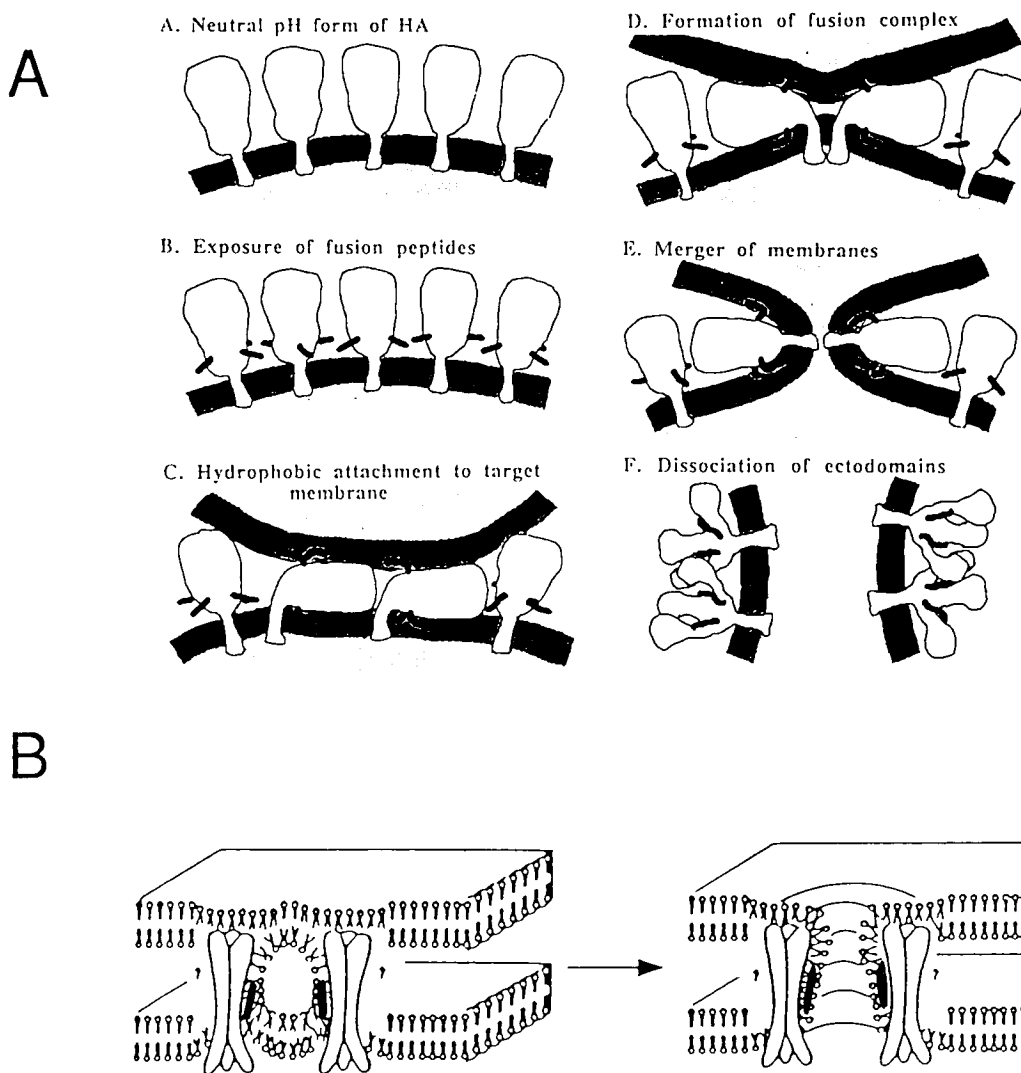


図1-3 インフルエンザウイルスが誘起する膜融合モデル。

A. 「融合ペプチド」が相対する膜に結合するとしたモデル。Stegmann et al, (1990)より引用(一部改)。B. 「融合ペプチド」が、ヘマグルチニン三量体内部に露出するとしたモデル。White (1990)より引用(一部改)。A. Bとも黒い棒が「融合ペプチド」を現す。

ウイルス	タンパク質	
<u>pH依存的</u>		
インフルエンザ	HA	三量体 サブユニットはHA1(58)とHA2(26)
VSV	G(64)	三量体
SFV	spike	三量体 サブユニットはE1(50), E2(50), E3(10)
MMTV	env	三量体 サブユニットはgp52(52)とgp36(36)
WNV	E(50) M(7)	三量体 単量体がEの三量体と相互作用する
<u>pH非依存的</u>		
センダイ	F	四量体 サブユニットはF1(45)とF2(15)
HIV	env	四量体 サブユニットはgp120(120)とgp41(41)
RSV	env	三量体 サブユニットはgp85(85)とgp37(37)

表1-1 おもなウイルスの膜融合活性タンパク質

カッコ内の数字は分子量(キロダルトン)。センダイウイルスのFとWNVのE以外は結合活性もある。この表で使った略号は、VSV(水疱性口内炎ウイルス)、MMTV(マウス乳癌ウイルス)、WNV(西ナイルウイルス)、HIV(ヒト免疫不全ウイルス)、RSV(ラウス肉腫ウイルス)。



### 1-1.B 受精

受精は、精子と卵の細胞間融合である。受精に関与するタンパク質の最初の候補はモルモット精子の膜タンパク質PH-30である。このことは、PH-30に対するモノクローナル抗体がモルモットの受精を阻害したことから明らかになった[Prinmakoff et al., 1987]。PH-30は、 $\alpha$  (60kDa)と $\beta$  (30kDa)の二つのサブユニットからなる。一次構造の解析から、 $\alpha$ には膜貫通部位のほかに、風疹ウイルスの膜融合タンパク質E2に含まれる「融合ペプチド」と相同性のある配列が見つかり、 $\beta$ には、細胞接着に関与するタンパク質であるインテグリンの結合部位が含まれることがわかった[Blobel et al., 1992]。つまり、PH-30には、標的膜との結合を担当する部分と膜融合を担当する部分を合わせもつ。これは、ヘマグルチニンを初めとした多くのウイルスの膜融合タンパク質の特徴でもある。この発見により、ウイルスの膜融合と、受精という細胞間の膜融合の二つの例が、類似のメカニズムにより制御されている可能性が強くなった。

酵母では、配偶子が接合し融合するまでの過程に、FUS1とFUS2の遺伝子産物が関与することが知られている[McCaffrey et al., 1987; Trueheart et al., 1987]。FUS1遺伝子産物 fus1は配偶子の接合部位に局在するが、fus2については解析が進んでいない。どちらのタンパク質も、直接膜融合を媒介しているかどうかは不明である。

## 1-2 細胞内の膜融合

真核細胞では、膜タンパク質や細胞外に分泌されるタンパク質などは、小胞体に結合しているリボソームにより合成される。合成されたタンパク質は、ゴルジ体に運ばれて糖鎖の修飾などを受けた後、それぞれの目的地(リソソーム・形質膜・細胞外など)に、小胞に包まれて輸送されていく[Palade, 1975]。輸送を確実に行うためには、それを制御する機構が存在するはずであり、一連のタンパク質がこの働きを担っていると予想される。この細胞内小胞輸送は、三つの過程の集合と考えられる。まず、輸送するタンパク質を含んだ小胞が形成される過程。つぎにこの小胞が目的のオルガネラへと運ばれる過程。最後に、この小胞が目的のオルガネラと融合する過程。現在のところ、これらの過程を切り離して記述することはむずかしいので、細胞内膜融合だけでなく、細胞内小胞輸送全体に関する知見も説明することにする。また、細胞内のオルガネラ間のタンパク質輸送のなかには、小胞を介さないものも存在するが、それについては触れない。

### 1-2.A ゴルジ体間小胞輸送

ゴルジ体は小胞体に近いほうからシスゴルジネットワーク(CGN)・ゴルジ層板トランスゴルジネットワーク(TGN)の3つのコンパートメントに分けられる。CGNは、小胞体からの輸送小胞を受け取る場所であるが、形態的に明確に区別できる構造体ではなく、多くの小胞と網状の膜からなる。細胞を15℃で培養すると、分泌タンパク質の輸送がこの付近で停止することから[Saraste & Kuismanen, 1984]、15℃中間体と呼ばれることもあり、また、輸送小胞と共に運ばれてきた小胞体居留タンパク質が小胞体へと戻るための地点であることから、サルベージコンパートメント(salvage compartment)とも呼ばれる [Warren, 1987; Pelham, 1989]。どの名称も、厳密には異なる領域を指すのだが、最近では、より一般的な意味を表すCGNが使われることが多い[Huttner & Tooze, 1989; Hsu et al., 1991; Pelham, 1991]。

TGNは、ゴルジ体での修飾を終えたタンパク質が形質膜やリソソームへと運ばれる際の最終的な選別が行われる場所である[Griffiths & Simons, 1986]。CGNと同様に、TGNも複雑な構造をしている。ゴルジ体の形態を劇的に変化させ、見掛け上消失さ

せる試薬であるブレフェルジンAに対する感受性が、CGNやゴルジ層板とは異なる点もTGNの特徴である[Pelham, 1991; Lippincott-Schwartz et al., 1991]。

ゴルジ層板はいわゆるゴルジ体のことである。電子顕微鏡で観察できる偏平な袋が積み重なった形をしている。各層板は、機能の面から、シス・中間・トランスの三つのコンパートメントに分類されてきた。しかし、ゴルジ体の機能が当初考えられていたよりも複雑であることが判明するにつれて、コンパートメントの数もはっきりしなくなり、古典的な分類の意義は薄れつつある[Mellman & Simons, 1992]。

ゴルジ体間小胞輸送は細胞内の小胞輸送研究のなかで、もっとも精力的に調べられている[Rothman & Orci, 1992; Pryer et al., 1992]。研究が進展したのは、BalchとRothmanのグループによる、インビトロでのゴルジ体内小胞輸送再構成の成功からである[Balch et al., 1984]。彼らはまず、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)の15Bクローン細胞にVSVを感染させてゴルジ体(ドナー)を調製した。この細胞は、ゴルジ体の中間層板に存在するN-アセチルグルコサミントランスフェラーゼIを欠損しているので、糖タンパク質にN-アセチルグルコサミンを付加できない。このドナーゴルジ体と、VSVを感染させてない野生型CHO細胞から調製したゴルジ体(アクセプター)とをインキュベーションすると、VSVのGタンパク質がドナーからアクセプターへと移行して、N-アセチルグルコサミンが付加されることを見いだした。このアッセイ法と電子顕微鏡観察によって、ゴルジ体間小胞輸送には、ATPと細胞質成分が必要であることや、輸送小胞の被覆を構成するタンパク質は、エンドサイトーシス経路で発見された被覆タンパク質であるクラトリンとは異なることがわかった[Rothman & Orci, 1992]。

ゴルジ体をN-エチルマレイミド(NEM)で処理してタンパク質を修飾すると、層板からの小胞の生成は阻害されないが、小胞と層板との融合は阻害された。そこでNEMによる阻害を回復させる因子を精製したところ、サブユニット分子量76kDaの四量体からなるタンパク質であることがわかり、NSF(NEM sensitive fusion protein; NEM感受性膜融合活性タンパク質)と名付けられた[Block et al., 1988]。NSFの一次構造は、酵母の小胞体からゴルジ体への輸送に参与するSec18pタンパク質と相同性がある[Wilson et al., 1989]。さらに、NSFがゴルジ膜に結合するために必要な三つのタンパク質が精製され、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -SNAPと名付けられた。このうち、 $\alpha$ -SNAPは、Sec18p

と相互作用することが遺伝学的に証明されていたSec17pの活性を補完できることがわかった[Clary & Rothman, 1990; Clary et al., 1990]。すなわち、ゴルジ体間小胞輸送を制御する分子機構が、酵母から動物細胞に至るまで共通していることが示唆された。

Rothmanらは、再構成実験に必要な因子(ATP、細胞質タンパク質、温度)が、反応のどの段階に働くかを反応速度から解析した。そして、NSFが、ゴルジ膜に結合した非クラトリン被覆小胞から被覆が脱離してから、融合が完了するまでの間に参与すると予想した(図1-4)。つまり、NSFが、細胞内の膜融合を制御することが予想される最初のタンパク質であると主張した。ただし、ウイルスの膜融合と異なり、NSFだけで膜融合を完了させるのではなく、SNAPなどのタンパク質との複合タンパク質系(沈降定数から、20S 粒子と名付けられた)が膜融合を制御すると考え、融合装置(fusion machine; 図1-5)という概念を提唱した[Wilson et al., 1992]。NSFは、ゴルジ体間小胞輸送のほかに、小胞体-ゴルジ体間輸送とエンドソーム融合にも関与することが明らかとなり[Beckers et al., 1989; Diaz et al., 1989]、細胞内小胞輸送での膜融合活性タンパク質として普遍的役割を果たすと考えられるようになった。しかし、現在までのところNSFが膜融合を引き起こす直接の証拠はない。

ゴルジ体間小胞輸送に続いて、小胞体とゴルジ体間の膜小胞輸送も同様の原理で再構成され、輸送には、ATP、細胞質タンパク質、カルシウムイオン(至適濃度 0.1  $\mu$  M)が必要であると報告されている[Beckers et al., 1987, 1989, 1990; Beckers & Balch 1989]。

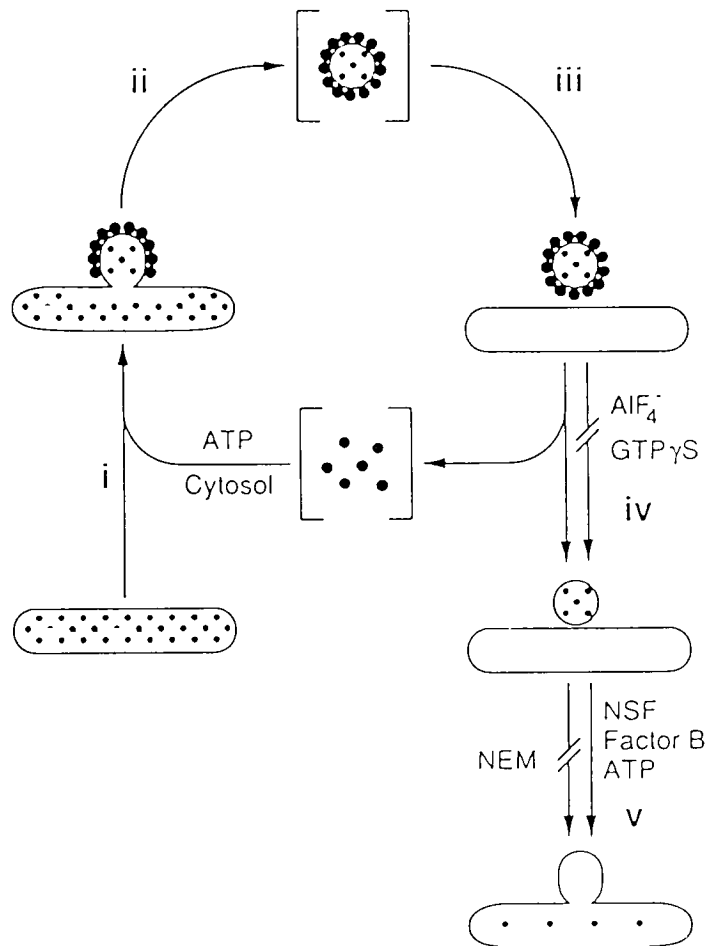


図1-4 ゴルジ体間小胞輸送の各段階を示した模式図

融合は、図のVの段階で起こる。NSF, ATP以外の因子をFactor Bと記述しているが、最近では、20S粒子と呼んでいる(図1-5参照)。小胞の周りの大きな黒丸は、被覆タンパク質を表す。Orci et al.,(1989)から引用。

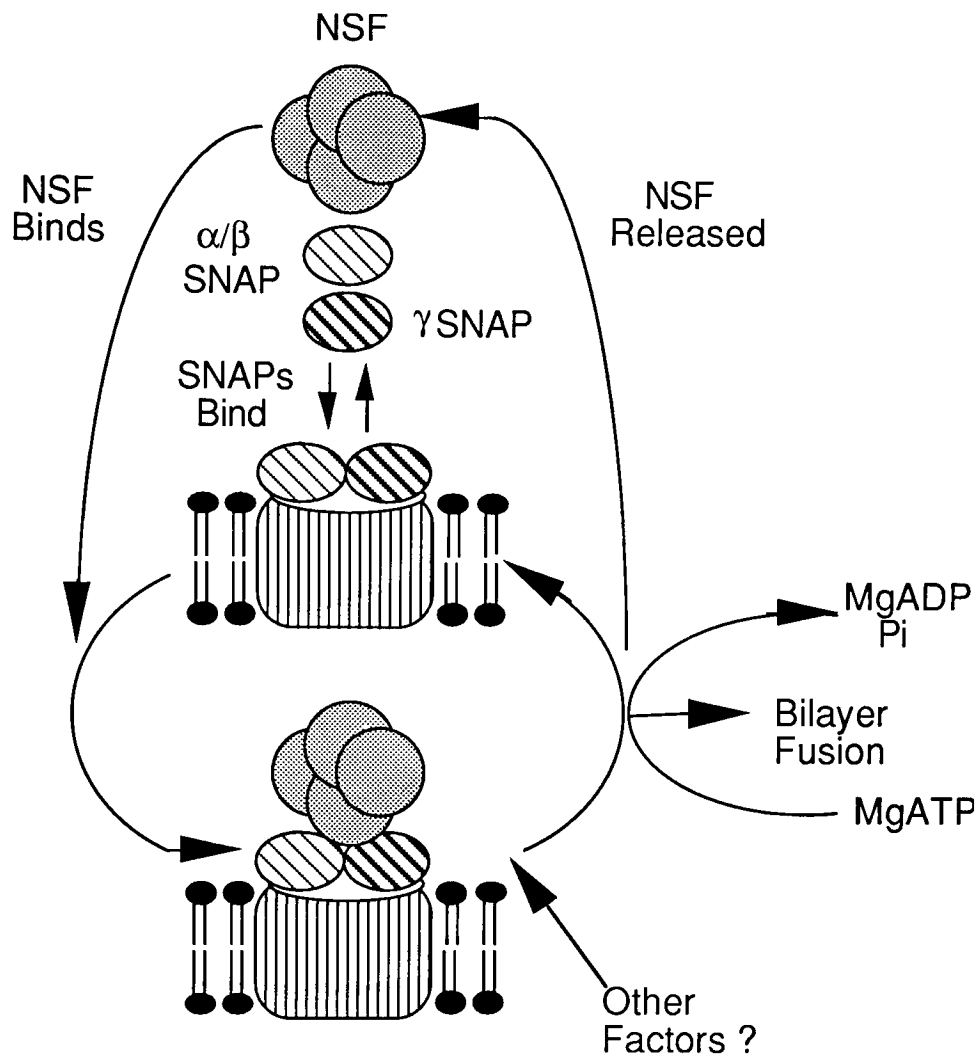


図1-5 Rothmanらの提唱した「融合装置」の模式図。

NSFや SNAPなどが膜融合を制御するために、ゴルジ体膜上の受容体にATP依存的に会合・解離する様子を表したもの。膜は実際は脂質二重層であるが、一層のみを表してある。各構成要素の量比は不明であるが、図では単純化してある。Wilson et al. (1992)より引用(一部改)。

## 1-2.B エンドソーム融合

エンドソーム同士の融合をインビトロで再構成した例は多数報告されている[Gruenberg & Howell, 1989; Pryer et al., 1992]。エンドソームが、その性質上、外来の物質をとりこむことが、エンドソーム融合の研究を進展させたのである。

エンドソーム融合測定の代表的な方法は、Braell (1987) の方法である。この方法は、まず、アビジン標識酵素を取り込ませた細胞から調製したPNS(細胞のホモジネートから核を除いたもの)と、ビオチン化IgGを取り込ませた細胞から調製したPNSをインキュベーションした後、膜を可溶化して、IgGを単離する。もしPNS中のエンドソームが融合すると、アビジン標識酵素とビオチン化IgGとがエンドソーム内で複合体を作るので、単離したIgGのなかで、融合したエンドソーム内にあったものだけが酵素活性をもつことになる。そのため、酵素活性を測定して膜融合活性を見積ることができる。この方法は、取り込ませる物質の種類をかえて受容体媒介エンドサイトーシスさせるなど多くの応用例を生んだ。

多くのアッセイ法で、細胞質タンパク質とATPが、融合に必要であり、エンドソームが融合能を保持できるのは、形成後5分以内であると報告されている[Gruenberg & Howell, 1989]。このほか、低分子量GTP結合タンパク質のひとつである rab5 [Gorvel et al., 1990]やADPリボシル化因子[Lenhard et al., 1992]、三量体型GTP結合タンパク質 [Colombo et al., 1992]、cdc2キナーゼ [Tuomikoski et al., 1989]、サイクリン B[Thomas et al., 1992]、微小管と微小管結合タンパク質[Bomsel et al., 1990]がエンドソーム融合に関与することが報告されている。しかしこれらの因子が膜融合に直接関係するかどうかは明らかではない。また、外来物質を簡単に導入できる利点は、インビボでのエンドソーム融合の測定を可能にした[Salzman & Maxfield, 1988, 1989; Kusumi et al., 1991]。

細胞内の小胞輸送をインビトロで再構成した例はこのほかにも、TGNから形質膜 [Woodman & Edwardson, 1986; Miller & Moore, 1991]、ゴルジ体から液胞[Vida et al., 1990]、エンドソームとTGN間[Goda & Pfeffer, 1991]などがある。アッセイ方法は、ゴルジ体間小胞輸送やエンドソーム融合で使われた方法を、改良したもので、本質的な変更はない。これらほとんどすべての再構成系でATPと細胞質タンパク質が必要であるとされているが、反応機構の解析は全くなされていない。

以上、細胞内小胞輸送を再構成した例を挙げてきた。いくつかのタンパク質が、輸送に関与するとされているが、実際に再構成系での活性が確認されたタンパク質はNSF, SNAP以外には、酵母の変異株から得られたSec23p[Hicke & Schekman, 1989]とSar1p[Oka et al., 1991 & d'Enfert et al., 1991](いずれも小胞体-ゴルジ間に関与)しかない。これはアッセイ方法の複雑さに起因すると考えられる。

### 1-2.C エキソサイトーシス

エキソサイトーシスには二種類ある。ひとつは、タンパク質や低分子を恒常的に分泌または形質膜に輸送するもの、もうひとつは、分泌小胞が形質膜直下に待機していて、ある刺激(細胞内のカルシウム濃度の増大など)に応答して内容物を一斉に放出するものである。前者は基本的にどの細胞でも観察されるが、後者は精子の先体反応における溶解素の放出、卵細胞の表層顆粒の崩壊、内分泌細胞や外分泌細胞での分泌顆粒、神経伝達物質の放出の際に見られる。いずれにせよ、分泌小胞と形質膜との膜融合が起こるのだが、この章では後者の反応をエキソサイトーシスとして扱う。

エキソサイトーシスの測定にはパッチクランプ法という強力な手段がある[Neher & Marty, 1982]。これは、融合にともなう形質膜の表面積の増加、すなわち、膜の電気容量の増加を測定するもので、数個ときには一個の分泌小胞の融合を測定できる。これは、細胞内の膜融合をリアルタイムで測定できる数少ない例である。とくに、ある遺伝的欠陥をもつマウス(ベージュマウス)の肥満細胞は光学顕微鏡で観察できるぐらい巨大(直径1-5  $\mu$ m)な分泌小胞をもち[Curran et al., 1984]、融合一回当りの電気容量の増加が大きいので、エキソサイトーシスの研究に盛んに使われてきた[Breckenridge & Almers, 1987]。

電気生理的研究の成果から、エキソサイトーシスにおける膜融合の特徴として、非常に漏れの少ない効率の良い膜融合が起こることと、刺激の開始から反応の終了までの時間が短い(神経細胞でのシナプス小胞からの神経伝達物質の放出では約0.5ミリ秒)ことがわかってきた。この反応速度の速さは、一段階の酵素反応と仮定してもかなり速いもので、ましてや、ゴルジ体で考えられたような「融合装置」が融合を



制御しているとは考えにくい。この事実と、電子顕微鏡での観察から、あらかじめ形質膜または分泌小胞の膜に構成されたチャネル様のタンパク質複合体が、刺激に応答してコンホメーション変化を起こし、膜融合を完了させるというモデルが提唱された。このチャネル様のタンパク質複合体を「融合孔(fusion pore)」と呼ぶ(図1-6)。

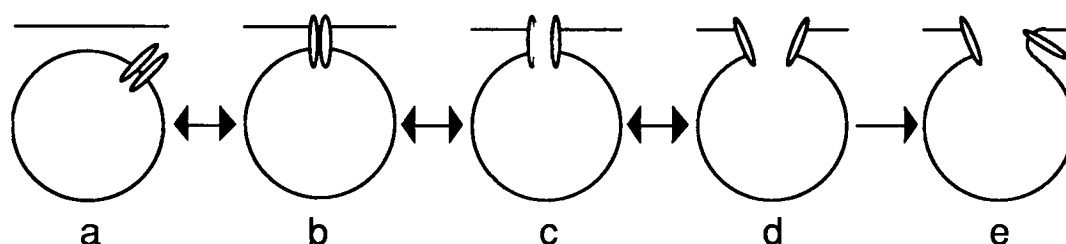


図1-6 融合孔を介するエキソサイトーシスのモデル。

Almers, (1990)より引用(一部改)。以下の説明もAlmersの説に基づく。

タンパク質の複合体は、分泌小胞に存在するように書いてあるが、形質膜(またはギャップ結合のように両方)に存在する可能性もある。小胞が形質膜に到達すると、タンパク質複合体も形質膜に挿入される(a, b)。細胞内カルシウムの上昇などのシグナルを受けるとタンパク質複合体がコンホメーション変化を起こし、孔が形成される(c)。複合体間の親和性が弱まると、形質膜の脂質が複体内に流れ込み、孔が大きく広がる(d)。ここまでは、可逆的な過程と考えられる。その後も孔が拡大を続け(e)、電子顕微鏡で観察できるぐらいの大きさになる。

融合孔を構成する分子については、タンパク質だけからなる、タンパク質と脂質の複合体からなる、脂質の周りをタンパク質が骨組みを作る、などの説があるが[White, 1992]、分子の同定にはいたっていない。しかし、実際の測定に基づいている点や脂質二重層との相互作用にまで、言及している点は、ゴルジ体小胞輸送の「細胞装置」モデルよりも成熟している。

つぎに、これまで生体膜のモデル膜として、ウイルスの膜融合解析などのために使われてきたリポソームについて述べる。

### 1-3. リポソームの膜融合

リポソームは、リン脂質などの両親媒性脂質により構成される閉鎖小胞である。Banghamらが、卵黄ホスファチジルコリンの水溶液の分散物が、浸透圧に応答して形を変え、カチオン グルコースなどを内包できることを示したのがリポソームに関する最初の記述である[Bangham et al., 1965]。リポソームは脂質二重層の数により、一枚膜リポソームと多重膜リポソームとに分けられる。膜融合を測定する目的で使われるのは、一枚膜リポソームである。一枚膜リポソームは、その大きさからSUV、LUV、GUVに分けられる。大きさと名称について、厳密な定義はなされていないが慣習として、SUVは直径100 nm以下のもの、LUVは100 nmから1  $\mu$  m, GUVはそれ以上のものに対応する。

#### 1-3.A リポソームを使った膜融合の解析法

リポソーム融合の解析は、(図1-1)で示したような膜融合の中間体を解析することにはかならない。つまり、どの段階が律速となるのか、その時リポソームはどのような構造を取り、その中間体形成に必要な因子はなにかを明らかにすることである。実際の膜融合測定は初めと終わりの状態を区別するに過ぎないので、中間体を研究するには工夫が必要である。そのためのアプローチとして、反応速度論的解析が行われてきた。

これまで、膜融合を速度論的に解析するために、質量作用反応モデルが用いられてきた[Nir et al., 1980; Nir et al., 1983]。これは、二つの同種のリポソームの会合・解離・融合について、それぞれ速度定数を定義し、会合が律速段階の場合と融合が律速段階の場合について膜融合活性を計算し、実際の測定値(反応速度が測定できるような方法)と比較して、膜融合の律速段階を推測するものである。リポソームと細胞膜の融合を解析する場合には、細胞膜上にいくつかの融合部位が存在し、ひとつひとつが独立に融合できると仮定して、同種のリポソームの融合と同様に解析する。

この方法は、ひとつの膜が複数の膜とは融合せず、解離が会合に比べて無視できるくらいに遅いと仮定して、初めて実用になる。

速度論的解析を可能にしたのは、リポソーム融合の測定技術の進歩である。リポソーム融合は、電子顕微鏡[Papahadjopoulos et al., 1975]、示差走査熱量測定[Papahadjopoulos et al., 1974]、核磁気共鳴[Kantor & Prestegard, 1975]、スピンラベル電子スピン共鳴[Maeda & Ohnishi, 1974]などの方法で測定されてきた。近年では、蛍光法による測定[Struck et al., 1981; Wilschut et al., 1980; Ellenz et al., 1985]が、その簡便さと感度の良さ、リアルタイム測定が可能な点で、広く用いられるようになった。とくに、蛍光性脂質の共鳴エネルギー移動に基づく測定方法[Struck et al., 1981]は、融合する膜の一方だけを標識すれば十分なので、生体膜との融合に応用されてきた。

リポソーム融合の研究のもうひとつの特徴は、構造からのアプローチがなされてきた点である。生体から抽出したリン脂質は、温度と共に相転移し(図1-7)に示したような構造を取ることがX線回折やフリーズフラクチャー法により、予測されている[Bentz & Ellenz, 1988]。これらの構造のなかで膜融合研究に関連が深いのは、「逆ミセル構造」である(図1-7C)。この構造は、リポソーム融合が起こる際に生起することが時間分解極低温電子顕微鏡で直接観察されているし[Siegel et al., 1989]、インフルエンザウイルスの膜融合の際にも形成されると予想されている(図1-3参照)。

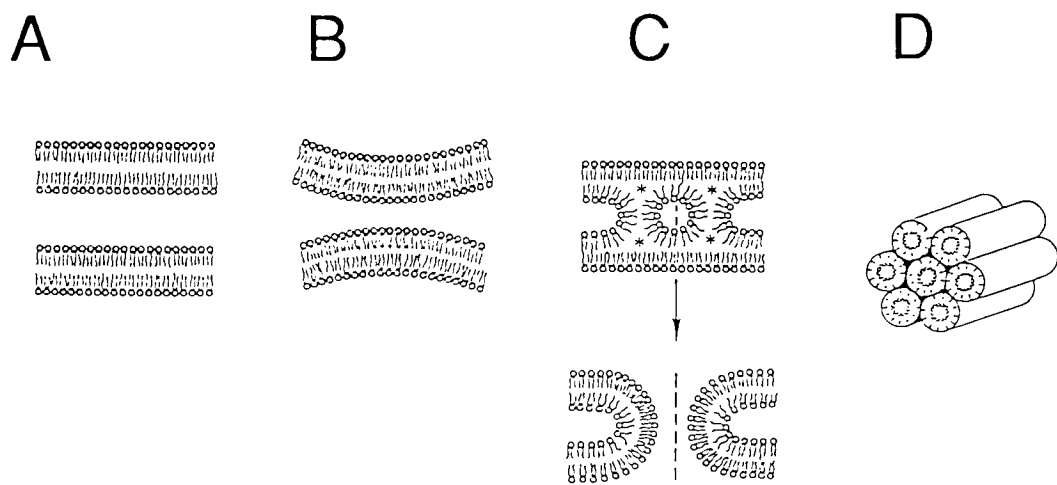


図1-7 生体膜由来のリン脂質が取ると考えられている構造のモデル。

A.ゲル相、B.液晶相、C.逆ミセル、D.ヘキサゴナルII。逆ミセルから融合に至るモデルも示されている。Bentz & Ellens, (1988)から引用。

### 1-3.B リポソームと生体膜との融合

生体膜とリポソームの膜融合は、その目的から、大きく二つに分けられる。ひとつは、細胞内に物質を導入する目的、もうひとつは、生体機能を模倣し、その制御機構を明らかにするためである[小林, 1992]。後者の例では、リポソームを使用して、ウイルスの膜融合に関する数多くの知見が得られたのは前述のとおりである。しかし、ウイルスとリポソームの融合を除くと、これまでにリポソームと生体膜の融合を測定した例は少ない(表1-2)。また、これらの例では、生体膜の活性に注意が払われていない点や、非特異的に融合しやすい酸性リン脂質やSUVを使用しているところに問題がある。したがって、特徴的な知見は得られていない。また、細胞から単離してきた膜以外に形質膜に高分子が通過できる穴を開けた細胞のゴルジ体とリポソームが融合することを示した例もある[Kobayashi & Pagano, 1988]。

生体膜	リポソーム組成	備考	文献
クロマフィン顆粒 (ゴースト)	LUV (CL/PC/Chol)	顆粒の膜タンパク質	a
クラトリン被覆小胞 (被覆を除いたもの)	SUV(PA,PS)	DOPC, PC, PEは無関係	b
ミクロソーム (粗面小胞体)	SUV(PC/PE/PA)	ミクロソーム膜タンパク質 Cholは、融合を阻害 細胞質タンパク質が融合を促進	c
ウニ卵表層顆粒	LUV (DPPC/Chol, PI/Chol)	Ca <sup>2+</sup> 、顆粒の膜タンパク質 Cholは融合に必要	d

表1-2 リポソームと生体膜の融合。

すべて、蛍光法による膜融合(脂質混合)測定法を行っている。文献は(a) Bental et al., (1984); (b) Lawaczeck et al., (1987); (c) Martinez-Bazenet, et al., (1988); (d) Vogel et al., (1992). この表で使用した略号は、CL; カルジオリピン、Chol; コレステロール、PA; ホスファチジン酸、DPPC; ジパルミトイルホスファチジルコリン、PI; ホスファチジルイノシトール。その他は、略語表を参照。

#### 1-4. 本研究の目的と結果の要旨

以上のように、膜融合が生物の機能に必須の過程でありながら、膜融合の分子機構の解明までには至っていない。とくに、細胞内の膜融合に関しては、そこに関与する分子の同定すらほとんど行われていないのが現状である。現在までのところ、細胞内の膜融合過程に関与するタンパク質のうち、インビトロ再構成系で活性が確認できたのはわずかに五種類である。このうち、膜融合活性をもつことがわかったのはひとつもない。これは、たとえば、インフルエンザの膜融合が、膜融合タンパク質ヘマグルチニンの同定のみならず、活性発現のためのコンホメーション変化や融合にかかわる分子数まで解明されたのとは対照的である。その原因は、ひとつには、ウイルスを大量に純粋に得ることが可能だったからである。もうひとつには、膜融合測定法の問題がある。前述のとおり、リポソームを使って、ヘマグルチニンを誘起する膜融合に関する多くの知見が得られた。これに対して、細胞内の膜融合とくに小胞輸送に関するものは、粗精製の膜分画同士の融合を測定するものがほとんどである。この方法で測定できるのは、融合に伴う最終産物の生成量だけであり、融合の中間体などを識別することは不可能である。その上、酵素活性の測定に基づくため、反応速度の解析も困難であった。膜融合研究における測定法の重要性は、同じ細胞内の膜融合でも、エキソサイトーシスに関しては、パッチクランプ法を使って研究が進み、融合孔の概念を導きだせた点からも明らかである。

そこで、本研究では、細胞内の膜融合の分子機構を解明する目的で、細胞内のオルガネラ膜としては、もっとも、膜の動的な活性に富み、その機能を果たすために膜融合が必須であるゴルジ体に注目した。また、融合のモデル膜としてリポソームの使用を試みた。そして、従来の細胞内の膜融合測定や、リポソームと生体膜の融合測定での問題点を考慮にいれ、

1. リアルタイム、定量的測定
2. 融合に使用した生体膜の性質

をとくに念頭において、ウサギの肝臓から単離したゴルジ体膜と中性リン脂質リポソームの膜融合測定を行った。

具体的には、1のために、リポソーム融合の測定で多くの成果を挙げてきた、蛍光を使った脂質混合法と内水相混合法で膜融合を測定した。2のためには、ゴルジ体の

調製法として、活性を保持したまま単離できる方法を使い、融合した膜の同定のために電子顕微鏡観察とゴルジ体特異的モノクローナル抗体による免疫沈降を行った。さらに、ゴルジ体以外の膜分画の融合活性を調べ、反応速度の違いを明らかにした。

その結果、融合は、ゴルジ体の膜タンパク質、イオン強度、温度依存的に起こること。低温、または低イオン強度下では脂質混合は阻害されるが会合は阻害されないこと、多くの細胞内膜融合で必要とされる、ATPや細胞質タンパク質は融合に必要でないことを明らかにした。

最後に、本論文で使用した言葉の定義をしておく。

膜融合(または融合) (図1-1)で示した各過程(会合、脂質混合、内水相混合)の全体を示す。ただし、会合を分けて記述した場合は、脂質混合と内水相混合を膜融合と記述した。

ゴルジ体・この言葉の定義としては、広義のものを採用した。すなわち、「タンパク質の分泌経路において、小胞体以降の、CGNやTGNを含む一連の膜構造体」を示すことにする。

リポソーム・SUVとLUVの両方を指す。どちらか一方を指す場合は、SUVまたはLUVと明記した。



## 2. 実験方法

試薬や器具の製造会社名は、初出時に付記した。特に明記していない試薬は和光純薬またはナカライテスク社製である。濃度は原則として、最終濃度を示した。遠心はすべて、4℃で行った。

## 2-1 使用した溶液の組成

PBS: 137mM 塩化ナトリウム、2.7 mM 塩化カリウム、1.5mM リン酸一カリウム、8mM リン酸水素二ナトリウム、pH 7.4

Hepes 緩衝液・145 mM 塩化カリウム、5 mM Hepes-水酸化カリウム、pH 7.4

ショ糖-Hepes 緩衝液 0.25 M ショ糖、5 mM Hepes-水酸化カリウム、pH 7.4

ST: 任意の濃度(実際に使用した濃度は直前に記した)のショ糖溶液に、10mMのTrisを加え、塩酸でpHを7.4にしたもの

STE: STに5mMEDTAを加えたもの

STM: STに10 mM 塩化マグネシウムを加えたもの

抗体結合緩衝液: 3 M 塩化カリウム, 50 mM ホウ酸ナトリウム, pH 9.0

## 2-2 リポソーム調製方法

脂質フィルムの作成・クロロホルムに溶解した脂質および蛍光性脂質を、脂質/NBD-PE/R18 = 97/1.5/1.5 (モル比)になるように試験管内で混合し、窒素ガスを吹き込んで、試験管の管壁にフィルム状に乾燥させた。クロロホルムを完全に除くために、試験管を真空デシケーター内に12時間以上置いた。本実験で使用した脂質はつぎのとおり。DOPC(Sigma社)、PS(牛脳由来; Sigma社)、PE(卵黄由来; Avanti Polar Lipids社)、卵黄PC (Singleton et al., (1965)の方法で調製したもの)、NBD-PE(Avanti Polar Lipids社)、R18(Molecular Probes社)、コレステロール(Avanti Polar Lipids社)。

SUVの作成・上記のように作成した脂質フィルムに、脂質の濃度が 10 mM になるようにHepes 緩衝液を加え、ついで、直径3 mm のガラスビーズを5、6個加え、ボルテックスミキサーで2分間激しく混合し、管壁の脂質フィルムをかきとった

(この処理で、多重膜リポソームができる)。脂質溶液をガラス製のサンプル瓶に移し、チタニウム製の振動子(直径7 mm)を備え付けた超音波発生装置(海上電機 TA-52)で5分超音波処理し、SUVを調製した。超音波処理の際には、脂質の酸化を防ぐために窒素ガスを吹き込んだ。

LUV(脂質混合法用)の作成[Szoka & Papahadjopoulos, 1978]：SUVと同じ組成の脂質フィルムに、ジエチルエーテル(3 mL)とクロロホルム(1 mL)を加え、脂質を溶かしナス型フラスコに移した。フラスコに、500  $\mu$  LのHepes緩衝液を加え、浴槽型超音波発生装置(Branson社 B-12 型)で5分超音波処理をして、乳化させた。つぎに、ロータリーエバポレーターで有機溶媒を蒸留した。脂質がゲル状になり、白濁したところで、いったん蒸留を停止し、Hepes緩衝液を500  $\mu$  L加え、蒸留を再開した。蒸留後、フラスコを45℃で湯浴し、有機溶媒を完全に除いた。このLUVを、ポリカーボネート膜(Nuclepore社)でろ過し(0.2  $\mu$  m 2回、0.1  $\mu$  m 1回)、大きさをそろえた。

LUV(内水相混合法用)の作成：Hepes緩衝液に溶解したHRP (5 mg/mL; 東洋紡績 Type I-C) またはFITC-デキストラン(1.0 mM、平均分子量17,200; Sigma社)1 mLを脂質フィルム(この方法で作成したLUVは、DOPC100%である)に加え、ボルテックスミキサーで混合した。脂質液(多重膜リポソームになっている)を、0.2  $\mu$  m および、0.1  $\mu$  m のポリカーボネート膜でろ過し、大きさをそろえると同時に、LUVにした。このLUVに、等量の25%フィコール溶液(Hepes緩衝液に溶解)を加え、よく混合した後、別の試験管に移し、10%フィコール溶液(Hepes緩衝液に溶解)、Hepes緩衝液をそれぞれ1 mLずつ重層し、遠心(3,000 rpm、15分、日立05PR-22 スイングローター)した[Shen et al., 1982]。遠心後、Hepes緩衝液と10%フィコール溶液との界面に集まったLUVを回収し、最下層に沈んだままの、LUVに取り込まれなかった HRP や FITC-dextran と分離した。この操作をもう1回繰り返し、洗浄を確実にした。

酢酸ウラニルネガティブ染色法による電子顕微鏡観察では、SUVおよびLUVの平均の直径は、それぞれ約30 nm と約200 nmであった。リポソームの濃度は、リン定量(2-14参照)で決定したリン脂質濃度で表した。

## 2-3 ゴルジ体膜の調製

ゴルジ体膜はウサギの肝臓から、Balch らによって改良されたTabas と Kornfeldの方法を使って調製した[Balch et al., 1984; Tabas & Kornfeld; 1979]。

ウサギ(日本白色種、2.5 kg)の肝臓を摘出し、結合組織・胆嚢を取り除き、氷冷した0.5 M STで余分の血液を洗った。メスで小さく切り刻み、肝臓の重量の5倍量の0.5 M STEを加え、ポリトロンホモジナイザー(Brinkman Instruments社)でホモジナイズした(PTA20S プローブ、30 秒間、2回、目盛り5)。ホモジネートを低速で遠心(2,500 rpm、10 分、Sorval SS-34 ローター)し、上清を回収し、2 枚重ねのガーゼで濾した。こうして生じた膜分画をPNS (post-nuclear supernatant、除核分画)と呼ぶ。あらかじめ、8 mL の 1.25 M STを入れておいた Beckman SW27ローター用遠心管にPNS を 30 mL 重層して遠心(25,000 rpm、90 分、Beckman SW27 ローター)した。1.25 M ST層のすぐ上の界面に集まった、白い膜の層を回収した。この分画をF1 と呼ぶ。F1 のショ糖濃度を屈折率計で測定し、適量の 2.0 M STを加えて、ショ糖濃度が1.2Mになるようにした。このF1(10 mL)をSW27ローター用遠心管に入れ、その上に、1.1 M(10 mL), 1.0 M (10 mL), 0.5 M( 8 mL) のSTを順に加え遠心(25,000 rpm、150分、Beckman SW27ローター)した。遠心後、0.5 M と 1.0 M STの界面に集まった膜を19ゲージ針をつけたシリンジで回収した。酵素活性測定のために、1.0 M と 1.1 M STの界面に集まった膜も同様に回収した。これらの膜分画をそれぞれ、F2 (ゴルジ体膜分画)、F3 と呼ぶ。膜分画は、液体窒素中で凍結し、冷凍(-80 °C)保存した。一度解凍した膜分画の再凍結は行わなかった。膜分画のタンパク質濃度は、Lowry の方法(2-14参照)で測定し、2.0 mg/mLに合わせた。

ラット(Whister 7週令、メス)からも、同様にしてゴルジ体膜を調製した。

## 2-4 形質膜 粗面小胞体膜・滑面小胞体膜の調製

粗面小胞体・滑面小胞体 形質膜は、ウサギ(日本白色種)の肝臓を使ってFleischer & Kervia, (1978) の方法で調製した。以下、方法の概略を記す。

ウサギ肝臓のホモジネートは、ゴルジ体膜(2-3)と同様に調製した。ただし、ポリ

トロンホモジナイザーの替わりにテフロンホモジナイザーを使用した。

**形質膜** 肝臓のホモジネートに、STMで、ショ糖濃度を1.6Mに合わせた。この試料30mLに、8mLの0.25MのSTを重層し、遠心(23,000 rpm, 70分, Beckman SW28)した。0.25M/1.6Mの界面に集まった膜を回収し、0.25M STEで希釈し、洗浄した。この試料のショ糖濃度を1.45Mに合わせ、0.25M STを重層し、遠心(28,000 rpm, 60分, Beckman Type 30)し、0.25M/1.45M STの界面の膜を回収し、0.25M STEで希釈し、洗浄した。試料のショ糖濃度を1.35Mに合わせ、0.25M STを重層し、遠心(49,000 rpm, 30分, Beckman Type 50.2 Ti)して、界面から膜を回収し、0.25Mショ糖溶液で懸濁して、形質膜分画とした。

**粗面小胞体と滑面小胞体** 肝臓のホモジネートを遠心(3,500 rpm, 10分, Sorval SS-34ローター)し、上清を回収した。これを、さらに遠心(17,000 rpm, 10分, Beckman Type 30ローター)し、上清を回収した。この上清を再び遠心(20,000 rpm, 30分, Beckman Type 30ローター)し、上清と沈殿(沈殿Aとする)に分ける。上清は、さらに遠心(40,000 rpm, 60分, Beckman Type 45 Tiローター)し、沈殿を軽ミクロソーム分画とした。沈殿Aをショ糖溶液で懸濁し、1.5 Mショ糖濃度に合わせ、1.3 Mショ糖溶液を重層し、遠心(25,000 rpm, 60分, Beckman SW28ローター)し、1.3 Mショ糖溶液層を取り除き、2倍量の水で希釈して、遠心(40,000 rpm, 60分, Beckman Type 45ローター)し、沈殿を重ミクロソーム分画とした。

軽ミクロソーム分画と重ミクロソーム分画とを等量混合し、2倍量の0.25Mショ糖溶液を加え、さらに塩化セシウムを15mMになるように加えた。この試料を、1.3 Mショ糖-15 mM塩化セシウム溶液の上に乗せ、遠心(49,000 rpm, 110分, Type 50.2 Tiローター)した。界面を滑面小胞体、沈殿を粗面小胞体分画とした。滑面小胞体は等量の0.25 Mショ糖溶液と混ぜ、遠心(40,000 rpm, 60分, Beckman Type 45 Tiローター)して濃縮した。

なお、膜の過度の変性を防ぐために、2.0 M STをクッションとした。

## 2-5 電子顕微鏡観察用試料の作製

HRP (2.5 mg/mL) を含んだ DOPC LUV (0.3 mM) とゴルジ体膜 (0.3 mg/mL) を Hepes 緩衝液中で 37°C・15 分インキュベーションし、1.2 M (5 mL), 1.0 M (15 mL), 0.5 M (13 mL) ST の不連続密度勾配の最上部にのせ、遠心 (25,000 rpm、60 分、Beckman SW27 ローター) し、未反応の LUV を除いた。(ゴルジ体膜は 0.5 M / 1.0 M ST の界面に、LUV は、最上層に残る)。回収したゴルジ体膜に、等量のカルノフスキー固定液 (0.1 M カコジル酸ナトリウム緩衝液、pH 7.4 に 2% パラホルムアルデヒド、2.5% グルタルアルデヒド、0.5 mg/mL 無水塩化カルシウムを加えたもの) と混合し、室温で 30 分静置し、前固定を行った。遠心 (3,000 rpm、10 分、日立 05PR-22 スイングローター) し、上清を捨て、HRP 反応の基質である 3, 3'-ジアミノベンジジン (DAB; 同仁化学研究所) を 0.25 mg/mL 含む 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 を加え、室温に 30 分静置した。HRP 反応を開始させるために、最終濃度 0.0025% の過酸化水素を加えた。10 分、室温で遮光して静置し、遠心 (3,000 rpm、10 分、日立 05PR-22 スイングローター) して膜を回収し、0.1 M カコジル酸ナトリウム緩衝液に溶解したオスミウム酸 (1%) を加え、後固定を行った (室温 90 分静置)。固定後、遠心 (3,000 rpm、10 分、日立 05PR-22 スイングローター) して膜を回収し、70% エタノールを加え氷中で 10 分静置し、再び遠心する。この操作を、80%、90%、100% エタノールを使って繰り返し、徐々に脱水した。試料はエポン樹脂に包埋後、電子顕微鏡観察に使用した。

## 2-6 細胞の培養

細胞はすべて 5% 炭酸ガス存在下、37°C で培養した。培地は、正常ラット腎 (NRK: normal rat kidney) 細胞は、Ham F12 培地 (ニッスイ) に、5% のウシ胎児血清、50 U/mL のペニシリン (明治製薬)、50  $\mu$ g/mL のストレプトマイシン (明治製薬) を加えたもので培養した。ハイブリドーマは、RPMI 1640 培地 (ニッスイ) に、10% のウシ胎児血清、50 U/mL のペニシリン、50  $\mu$ g/mL のストレプトマイシンを加えたもので培養した。ただし、細胞融合後、2 週間は、上記の培地に 1.6 mM のチミジン、10 mM のヒボキサンチン、0.4 mM のアミノプテリンを加えた。

## 2-7 モノクローナル抗体の作製

6週令のマウス(BALB/c, メス)に、Freundの完全アジュバント(Difco社)とPBSに溶解したゴルジ体膜( $150\mu\text{g}$ )とを等量混合して乳化させたものを腹腔内投与した。3週間後、Freundの不完全アジュバント(Difco社)と混合したゴルジ体膜( $150\mu\text{g}$ )を腹腔内に追加免疫した。追加免疫から1週間後、尾から採血し、ELISA法で抗体価を測定した。抗体価が1000以上のマウスには、さらに1週間後、PBSに溶解した $450\mu\text{g}$ のゴルジ体膜をアジュバントなしで腹腔内に投与した。最終免疫から3日後、脾臓を摘出し、マウスミエローマ(P3X63-Ag8.653)[Kearney et al., 1979]とポリエチレングリコール(分子量4000; Merck社)で細胞融合させた。成育してきたハイブリドーマの培養上清を採取し、間接蛍光抗体法(下記参照)でNRK細胞の核周辺部のゴルジ領域を特異的に染色するハイブリドーマを選び出した。この種のハイブリドーマを培養し、限界希釈法によるクローニングを2回繰り返し、大量培養を行った。抗体は、培養上清から硫酸アンモニウムで沈殿・濃縮し、PBSに透析した。抗体のサブクラスはIgG1であった。

## 2-8 間接蛍光抗体法

NRK細胞は、直径15mmのカバーグラス上で、48時間培養したものを用いた。細胞は、PBSで2回洗浄し、 $-20^{\circ}\text{C}$ で冷やしておいたメタノールを加え、 $4^{\circ}\text{C}$ で、5分静置して固定した。ノコダゾール( $10\mu\text{g/mL}$ ; Sigma社)やブレフェルジンA( $5\mu\text{g/mL}$ ; Epicentre Technologies社)処理した細胞を使う場合は、固定前にこれらの試薬を培地に加え、 $37^{\circ}\text{C}$ で60分インキュベーションした。固定した細胞は、1%ウシ血清アルブミン-PBS中で60分、一次抗体と60分インキュベーションした後、0.1%Tween 20-PBSで4回洗浄し、二次抗体(アフィニティー精製した、ローダミン標識抗マウスIgG抗体; Cappel社)と60分反応させた。インキュベーションはいずれも室温で行った。0.1%Tween 20-PBSで5回洗浄し、90%無蛍光グリセロール(Merck社)-10% PBSで、スライドグラス(マツナミ)上に乗せ、63倍の対物レンズ(カールツァイス社 Plan-APOCROMAT 63)を備え付けた蛍光顕微鏡(カールツァイス社 LSM10)で観察した。観察の際には、543 nmのヘリウム-ネオンレーザーで励起し、発光側に575-640

nm のバンドパスフィルターを使用した。

## 2-9 ゴルジ体膜の免疫沈降

プロテインA-セファロース CL4Bビーズ(湿潤容積 $400\mu\text{L}$ ; Pharmacia社)を5mgのモノクローナル抗体C6A3 または市販のマウスIgG(Zymed社)と抗体結合緩衝液中で、室温、1時間インキュベーションした。ビーズを抗体結合緩衝液で2回洗浄し、20mM dimethyl pimelimidateを含む抗体結合緩衝液で混和し、30分インキュベーションして、プロテインAと抗体とを架橋した。未反応のdimethyl pimelimidateを除くために0.2Mのエタノールアミン(pH8.0)を加え、さらにインキュベーションした。

HRP-LUVと融合させたゴルジ体膜(電子顕微鏡の項参照) $100\mu\text{g}$ 相当をプロテインA-セファロース CL4Bカラム(湿潤容積1mL)を通過させ、非特異的にビーズに吸着するゴルジ体膜を除いた。次いで、ゴルジ体膜を $50\mu\text{L}$ の抗体結合ビーズと混和し、 $4^{\circ}\text{C}$ で16時間震盪培養した。ビーズは氷冷したHepes緩衝液で3回洗浄したが、この時、インキュベーション中に凝集したゴルジ体膜が沈降するのを防ぐために、遠心機は使わず、自然沈降させた。洗浄後のゴルジ体膜のHRP活性はAl-Kaissi & Mostratos (1983)の方法で測定した。すなわち、ゴルジ体膜とインキュベーションしたビーズ( $20\mu\text{L}$ )に、0.1%のTriton-X 100を加えて膜を可溶化し、基質液(2.2mM *o*-フェニレンジアミン 0.007% 過酸化水素を含む100 mM クエン酸-リン酸緩衝液、pH 5.0)を1 mL加え、反応を開始した。 $37^{\circ}\text{C}$ で60分反応後、硫酸を最終濃度 1M加え、反応を停止した。ビーズを低速遠心で沈降させ、上清の492 nmでの吸光度を測定し、HRP活性の指標とした。対照実験として、TritonX-100で可溶化しなかったゴルジ体膜のHRP 活性も測定した。

## 2-10 膜融合測定

脂質混合法：蛍光分光光度計のマикроキュベット内で、 $50\mu\text{L}$ のゴルジ体膜を $280\mu\text{L}$ のHepes 緩衝液と混合し、 $37^{\circ}\text{C}$ で3分、あらかじめインキュベーションした後、 $20\mu\text{L}$ のSUVまたはLUVを加え、ただちに攪拌し、 $37^{\circ}\text{C}$ でインキュベーションした。アッセイ溶液中のゴルジ体膜の濃度は0.3 mg/mLタンパク質濃度、リポソ



ームの濃度は0.04 mM。NBDの530 nmでの蛍光強度(励起波長は470 nm)の増加を蛍光分光光度計(日立850S型)で測定した。温度制御はマイクロキュベット周辺に恒温水槽の水を循環させて行った。温度を変化させて測定するときは、リポソームを加える前のキュベットを、氷または水で測定温度になるようにインキュベーションしておいた。測定時間中の温度変化は、 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以下になるようにした。測定開始時のNBDの蛍光強度を外挿して求め、これを融合活性0%とし、0.2%TritonX-100を加えた後の蛍光強度を融合活性100%として膜融合活性を計算した。ATP(ヤマサ醤油)、GTP(ヤマサ醤油)、GTP $\gamma$ S(Sigma社)、塩化カルシウム、EGTA(同仁化学研究所)、バリノマイシン(Sigma社)、ナイジェリシン(Sigma社)などが融合に与える影響を調べる実験では、最終濃度の100倍の溶液を調製し、アッセイ溶液の1/100(3.5  $\mu\text{L}$ )を、リポソームを加える前にキュベットに加えた。

内水相混合法・FITC-デキストランを含むLUV(0.04 mM)とゴルジ体膜(0.3 mg/mL)とをHepes 緩衝液中 $37^{\circ}\text{C}$ でインキュベーションした。脂質混合法とは異なり、ゴルジ体膜をLUVのあとに加えた。融合にともなうFITCの530 nm(励起波長490 nm)の蛍光強度の増加を、脂質混合法と同様にして、蛍光光度計で測定した。この時、LUVから漏れたFITCの蛍光を消すために抗フルオレッセイン抗体(Molecular Probes社)を加えておいた。抗フルオレッセイン抗体を加えないときの、反応開始時の蛍光強度を0%融合、TritonX-100添加後の蛍光強度を100%融合として、融合活性を見積った。

## 2-11 ゴルジ体膜の処理

タンパク質分解酵素処理 ゴルジ体膜(2 mg/mL)に、タンパク質分解酵素を下に示す濃度で加え、氷中で、1時間インキュベーションした。反応停止は、それぞれのタンパク質分解酵素の阻害剤を加えた。対照試料は、反応開始時にタンパク質分解酵素とその阻害剤を同時に加えて作成した。

使用したタンパク質分解酵素と阻害剤の組み合わせ(カッコ内は最終濃度)はつぎのとおり、トリプシン(10  $\mu\text{g/mL}$ ; Sigma社Type XIII)とダイズトリプシンインヒビター(40  $\mu\text{g/mL}$ ; Sigma社); プロテイナーゼ K(1  $\mu\text{g/mL}$ ; Boehringer Mannheim社)と

PMSF(50  $\mu$  M; Sigma社)；サーモリシン(10  $\mu$  g/mL; Sigma社)とEDTA(5 mM)。ただし、サーモリシン処理の時は、2 mMの塩化カルシウムを加えた。

炭酸ナトリウム処理と高塩濃度処理[Fujiki et al., 1982; Weidman, et al., 1989]：ゴルジ体膜に2倍量の0.3M炭酸ナトリウム、pH 11.5 または、3M KCl, 5mM Hepes pH 7.3を加え、氷中で30分静置した。処理後のゴルジ体膜から、炭酸ナトリウム、塩化カリウムを除くため、0.5M/1.0 M ST 勾配の上に乗せ、遠心(40,000 rpm、60分、Beckman SW50.1 ローター)し、1.0 M ST 層の上からゴルジ体膜を回収した。

NEM 処理：ゴルジ体膜に1 mM のNEM(Sigma 社)を加え、氷中で30分インキュベーションした後、DTTを最終濃度 2 mMになるように加えて、反応を止めた。対照試料はNEMとDTTを同時に加えて作製した。

## 2-12 会合測定

脂質混合法と同様に、ゴルジ体膜とSUVを10分インキュベーションし、0.5 M-1.2 Mの連続密度勾配 STの上に乗せ、遠心(40,000 rpm、3 時間、Beckman SW50.1 ローター)した。遠心後、遠心管の底から300  $\mu$  L ずつ試料を回収した。それぞれの分画の、ショ糖濃度、R18の蛍光強度、280nmでの吸光度、マンノシダーゼ活性(2-13参照)を測定した。

また、脂質混合法と全く同様に、ゴルジ体膜とSUVを 5 分インキュベーションし、200  $\mu$  L の0.5 M STと150  $\mu$  Lの1.0 M ST からなる不連続密度勾配の上にインキュベーション後の試料(350  $\mu$  L)をのせ、遠心(40,000rpm、60分、Beckman SW50.1 ローター、356860アダプター付き)した。反応速度を測定する実験では、ウシ血清アルブミン 10 mg/mL 遠心後の試料は、上と下の2つの層に等分した。上の層には、ゴルジ体膜と結合しなかった遊離のSUVが含まれ、下の層には、ゴルジ体膜とそれに結合又は融合した膜が含まれる。両方の分画に、Triton X-100(最終濃度 0.2 %)を加え、NBD-PE とR18 の間の共鳴エネルギー移動や、ゴルジ体膜の光散乱を解消させたあと、NBD の蛍光強度を測定した。結合量は、次の式から計算した。

$$(\text{結合量}) = IL / (IU + IL)$$

IU, ILは、それぞれ上と下の層のNBDの蛍光強度

## 2-13 酵素活性測定

マーカー酵素の測定は以下のように行った。

ガラクトシルトランスフェラーゼの測定[Brew et al., 1979; Saraste et al., 1986] 試料50  $\mu$ L に対し、オボアルブミン(7 mg/mL)、ATP(2 mM)、UDP-ガラクトース(0.1 mM)、UDP-<sup>3</sup>H-ガラクトース(0.28  $\mu$  Ci)、塩化マグネシウム(20 mM)、Triton X-100 0.5%、Tris-HCl (50 mM)を加え(最終液量100  $\mu$ L)、37°Cで30分インキュベーションした。反応停止は、1 mLの1%リンタングステン酸/0.5M 塩酸を加えて行い、トリクロロ酢酸でタンパク質を沈殿 回収し、エタノール/エーテルで洗浄した後、オボアルブミンに転移した<sup>3</sup>H-ガラクトース量を測定し、酵素活性を見積った。

$\alpha$ -マンノシダーゼの活性測定[Tabas & Kornfeld, 1979] 試料20  $\mu$ g(タンパク質量)に対し、10 mM のパラニトロフェニル- $\alpha$ -D-マンノピラノシド(0.2M酢酸緩衝液、pH 5.4に溶解)を加え(最終液量40  $\mu$ L)、37°Cで90分インキュベーションした。反応停止は、2%の炭酸ナトリウムを600  $\mu$ L加えて行った。反応液の400nmでの吸光度を測定し、酵素活性を見積った。

5'-ヌクレオチダーゼ活性測定[Dewald & Touster, 1973] 試料200  $\mu$ g(タンパク質量)に対して、5'-AMP(5 mM)、塩化マグネシウム(5 mM)、塩化カリウム(100 mM)、Tris-塩酸(80 mM, pH 7.4)を加え(最終液量1 mL)、37°Cで60分インキュベーションした。反応停止はトリクロロ酢酸(10%)を加えて行った。遠心(10,000 rpm、10分、トミー精工MR15A固定角ローター)してタンパク質を除き、遊離したリン酸の量を測定し、酵素活性を見積った。

グルコース-6-ホスファターゼ活性測定[Swanson, 1955] 試料100  $\mu$ g(タンパク質量)にグルコース-6-リン酸(60 mM)、マレイン酸緩衝液(20 mM, pH 6.5)を加え(最終液量0.5mL)、37°Cで30分インキュベーションした。反応停止はトリクロロ酢酸(10%)を加えて行った。遠心(10,000 rpm、10分、トミー精工MR15A固定角ローター

)してタンパク質を除き、遊離したリン酸の量を測定し、酵素活性を見積った。

#### 2-14 その他

タンパク質の定量は、Lowryらの方法で行った[Lowry et al., 1951]。リン定量はBartlettの方法で行った[Bartlett, 1959]。

### 3. 結果

### 3-1 単離したゴルジ体膜の酵素活性

ゴルジ体膜は、ウサギの肝臓からショ糖密度勾配遠心法で単離した。この方法は、遠心の際に、膜を沈降させるのではなく、浮上させるようにしてあるので、膜の形態を損なわずにゴルジ体を単離できる利点がある(図3-1)。調製するときに生じた各分画にゴルジ体がどの程度濃縮されたかを調べるために、細胞内のオルガネラのマーカー酵素活性を、各分画について測定した(図3-1)。測定したのは、形質膜のマーカー酵素である 5'-ヌクレオチダーゼ、小胞体のマーカー酵素であるグルコース-6-ホスファターゼ、ゴルジ体のマーカー酵素であるガラクトシルトランスフェラーゼと  $\alpha$  マンノシダーゼである。F2分画のガラクトシルトランスフェラーゼ活性は、PNSに対して27倍あり、ゴルジ体はかなり濃縮されたことがわかる。ガラクトシルトランスフェラーゼに比べると、もうひとつのマーカー酵素のマンノシダーゼの比活性が低かった(13倍)。これは、マンノシダーゼがゴルジ体以外にも、リソソームや細胞質に存在する[Dewald, 1973]ためであると考えられる。これらのマンノシダーゼの至適pHや基質に対するミカエリス定数は互いに異なるのだが、本研究で用いた基質(パラニトロフェニルマンノピラノシド)の酵素特異性が低いために、ゴルジ体のマンノシダーゼの至適pH(5.4)で測定しても、他のマンノシダーゼの活性の影響を受けた恐れがある。したがって、測定されたPNSのマンノシダーゼ活性の一部は、細胞質やリソソーム由来のマンノシダーゼによると考えられる。つまり、PNSのマンノシダーゼ(ゴルジ体由来)の活性を実際よりも高く測定したことになり、その結果F2分画への濃縮率が低くなった可能性がある。

F2分画には、5'-ヌクレオチダーゼ(2.6倍)とグルコース-6-ホスファターゼ(1.7倍)の活性も若干濃縮されていた。形質膜や小胞体膜が混入した可能性はあるが、その程度は、比較的小さいことは濃縮率の低さを見れば明らかである。また、形質膜のマーカー酵素と言われる5'-ヌクレオチダーゼの活性があっても、必ずしも、形質膜の混入を示さないことも報告されている[Hino et al., 1978]。いっぽう、F1 および F3 分画には、ゴルジ体のマーカー酵素の顕著な濃縮は見られなかった。

以降、ゴルジ体分画またはゴルジ体膜と書いた場合、このF2分画を指す。

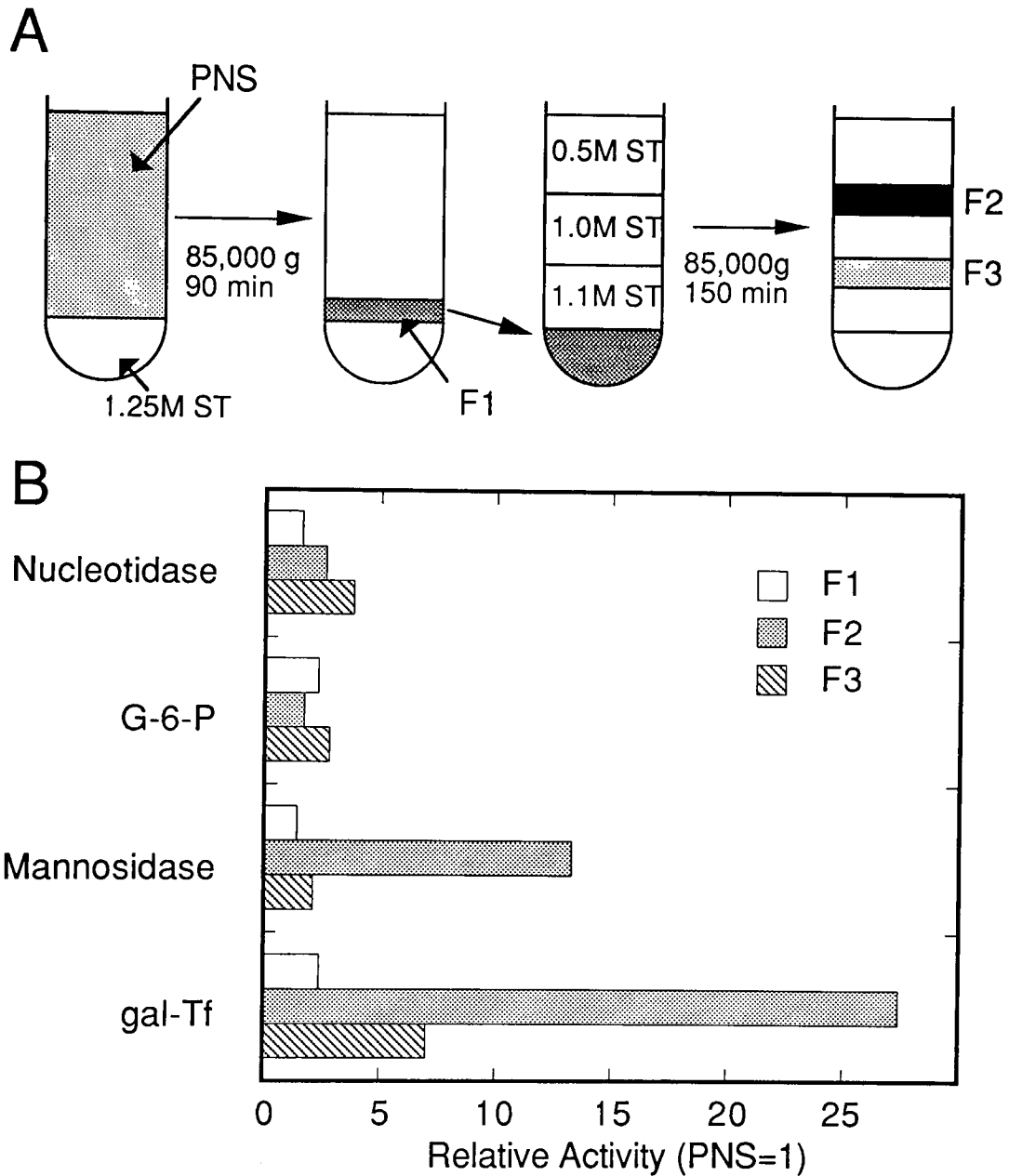


図3-1 ゴルジ体膜調製法の模式図(A)と各分画のマーカー酵素活性(B)。

酵素活性(3回の測定の平均値)はPNSでの活性を1としたときの相対値で表してある。図中、Nucleotidaseは5'-ヌクレオチダーゼ、G-6-Pはグルコース-6-ホスファターゼ、Mannosidaseは $\alpha$ -マンノシダーゼ、gal-Tfはガラクトシルトランスフェラーゼを表す。

### 3-2 HRP封入LUVとゴルジ体膜との融合

HRPを封入したDOPC-LUVと37℃で15分インキュベーションした後のゴルジ体膜から、未反応のDOPC-LUVを遠心で除き、電子顕微鏡で観察した。もしもLUVとゴルジ体膜が融合したら、LUV内のHRPがゴルジ体膜の内腔に移行すると予想できる。HRPの存在はDAB反応で確認できる。DABは単量体では膜を透過するが、HRPと過酸化水素の存在化で不溶性の重合体を形成し、電子密度が大きくなり、容易に可視化できるようになる。(図3-2)は、DAB反応後のゴルジ体膜の電子顕微鏡写真である。(図3-2)からわかるように、ゴルジ体膜は直径500nmの小胞状もしくは、扁平な袋状の形態をしており、周辺部には、それよりもさらに小さい小胞が見られた。組織切片の電子顕微鏡像で顕著に観察できる、積み重なった層板や輸送小胞と思われるものは見いだせなかった。DAB反応産物は、写真の黒く濃く染まっている部分であるが、ゴルジ体膜の内腔部分に限定して観察できた。ただし、DAB発色で見えるかぎり、融合した膜の形態に特徴はなかった。また、リソソーム、ミトコンドリア、核膜などの混入は見られなかった。ただし、小胞体、形質膜、エンドソーム膜がどの程度混入しているかは判断できなかった。融合した膜がゴルジ体由来であることを示すために、金コロイドを結合させたC6A3抗体を使って二重染色(免疫電顕技術)を試みたが、グルタルアルデヒド固定したゴルジ膜はC6A3の抗原性を失ってしまい実現できなかった。

しかし、DAB反応産物が、ゴルジ体膜の内腔に存在するのかそれともゴルジ体膜の外側に吸着しているだけなのかは写真からでは、はっきりしない。それゆえ、インキュベーションの際に、LUVから漏出し、ゴルジ体膜表面に非特異的に結合したHRPによるDAB反応産物がゴルジ体膜に吸着した可能性も考えられる。そこで、LUVから漏出したHRPを失活させることを試みた。そのために、ゴルジ体膜とLUVとのインキュベーション終了後、電子顕微鏡観察のための固定をする前に、最終濃度100  $\mu$ g/mLのトリプシンをアッセイ溶液に加え、37℃で30分間インキュベーションした。この条件で、1  $\mu$ g/mLのHRPを完全に失活させることができた。また、リポソームとのインキュベーション後(未反応のリポソームは除いてある)のアッセイ溶液全体に含まれるHRPの濃度を滴定したところ、約0.1  $\mu$ g/mLであった。したがって、アッセイ溶液に含まれるHRPがすべてLUVから漏出したものだと仮定しても、この



トリプシン処理で、ほぼ完全に失活できるはずである。

実際の測定では、Triton X-100 で膜を可溶化する前にトリプシン処理した場合のHRP活性は、トリプシン処理しなかった場合の95.5%(2回の測定の平均)だった。この活性の差(5%)が、漏出したHRP量に相当すると考えられる。電子顕微鏡観察では、トリプシン処理の有無に依らず、DAB反応には顕著な差が見られなかった。したがって、LUV内のHRPは、ゴルジ体の内腔に移行した、つまり、LUVとゴルジ体膜との融合が起こったことがわかった。

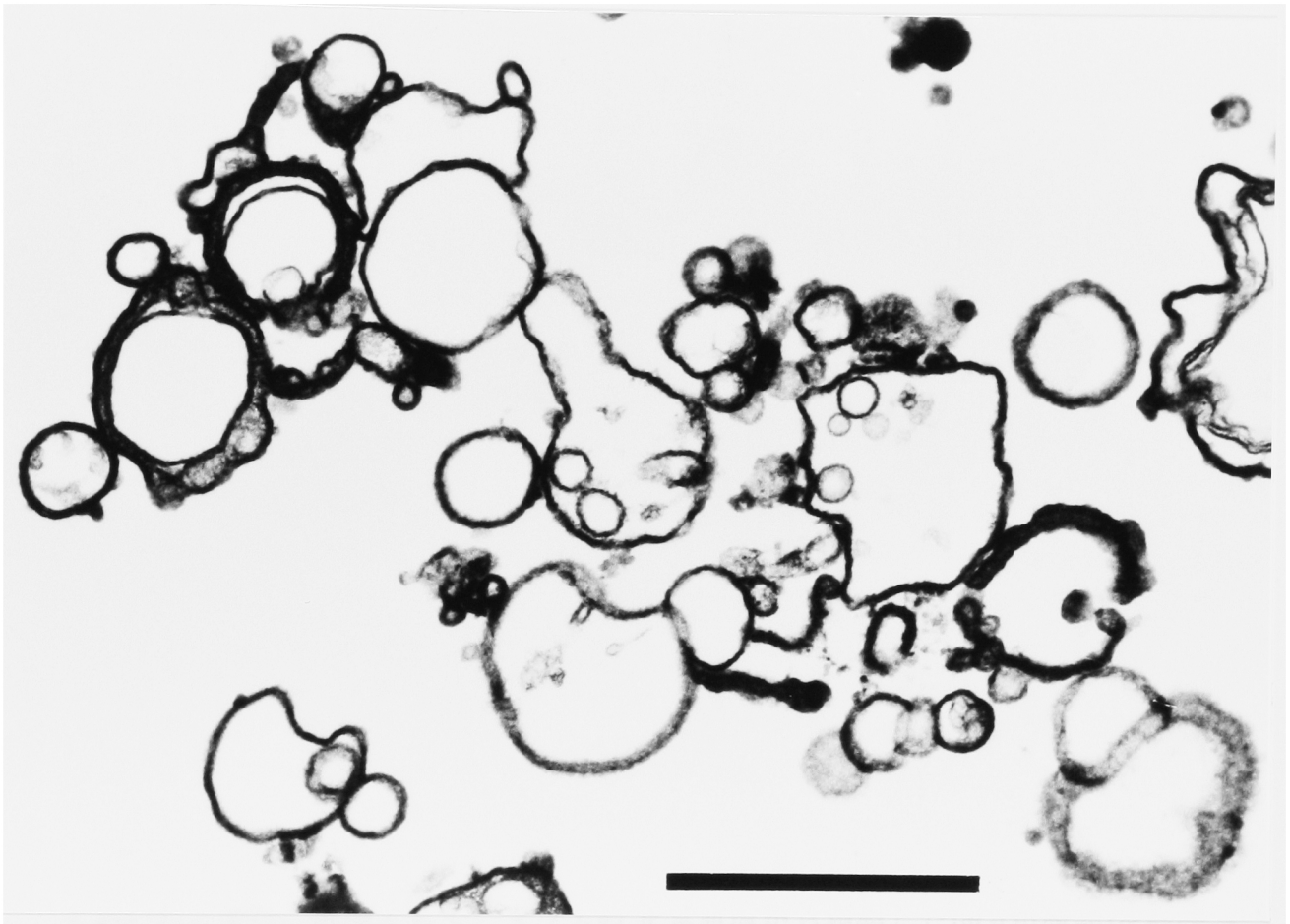


図3-2 HRP封入LUVと融合した後のゴルジ体膜の電子顕微鏡写真。

ゴルジ体膜はHRP封入LUVと37℃15分間インキュベーションした後、未反応のLUVを除いた。HRPは、DAB反応で可視化した。図中、黒く濃く染まっている部分がDAB反応産物である。横棒は1 $\mu$ mを表す。

### 3-3 ゴルジ体特異的モノクローナル抗体によるゴルジ体膜の単離

(図3-2)で観察された生体膜が、ゴルジ体由来のものか、それとも他のオルガネラ由来のものかは、顕微鏡写真からは特定できない。実際、本研究で用いた方法で得られたゴルジ体分画には、エンドソームや小胞体由来の膜が混入している可能性が大きい(3-1節で示したように、小胞体や形質膜の酵素活性は比較的小さいが、全くないわけではない)。そこで、LUVと融合した膜がゴルジ体由来である可能性を強める手段として、ゴルジ体に存在する抗原(少なくとも、他のオルガネラ膜に存在しないことが明らかな抗原)に対するモノクローナル抗体を使って、融合後の膜を単離することを試みた。この実験のために、ゴルジ体分画を抗原として、マウスからモノクローナル抗体(C6A3と名付けた)を作成した。C6A3の性質については、3-10章にまとめて記述した。

C6A3を結合させたプロテインA-セファロース CL-4B ビーズを、3-2章と同様に HRP-LUVと融合させたゴルジ体膜とを4℃で16時間インキュベーションし、ビーズに結合したゴルジ体膜の量を、HRP活性を指標として定量した(図3-3A)。非特異的にビーズに吸着したゴルジ体膜からの影響を取り除くため、抗体結合ビーズとインキュベーションする前に、抗体を結合させていないビーズを詰めたカラムを通過させておいた。また、対照として、マウスの正常血清から精製したIgG(市販品)を結合させたビーズも作成し、融合後のゴルジ体膜とインキュベーションした。(図3-3B)のようにC6A3結合ビーズと共に沈降したゴルジ体膜からのHRP活性は、対照である正常マウスIgGを結合させたビーズと共に沈降したゴルジ体膜からのHRPの約5倍であった。なお、測定されたHRP活性の範囲内では、HRPの濃度とHRP活性(反応産物の吸光度)とは、ほぼ比例する[Ohashi & Ohnishi, 1991]。この結果から、HRP-LUVは、C6A3に認識される抗原を含む膜、すなわち、ゴルジ体由来の膜と融合したことがわかる。ただし、この方法によりビーズと共に沈降してきたHRPの量は全HRP活性の約30%だった。しかし、インキュベーション中に漏れたHRPは、抗体で回収できないので、実際に回収したのは融合した膜の1/3以上になるはずである。残りの分画に含まれる膜は他のオルガネラ由来の膜と、この抗体に認識されなかったゴルジ体由来の膜であると考えられる。

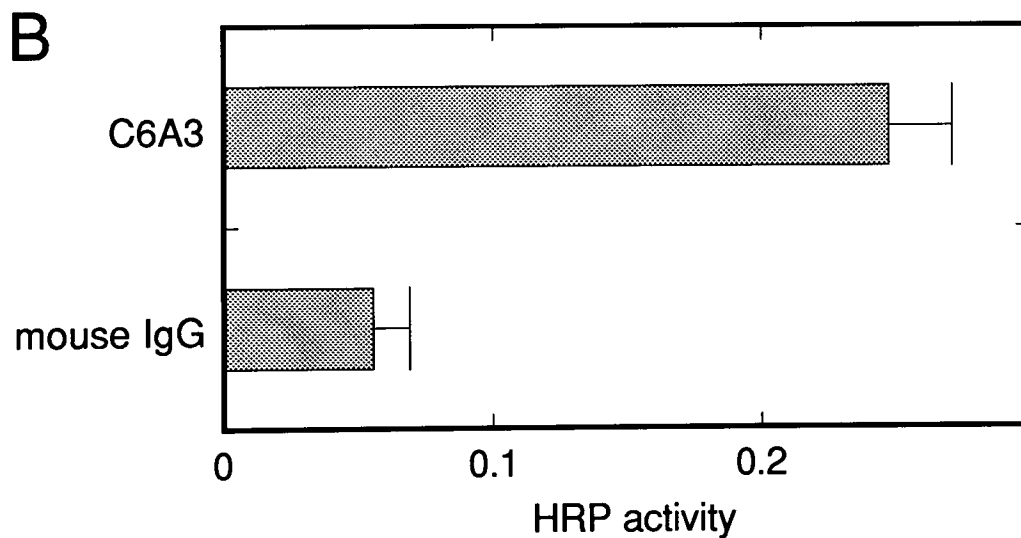
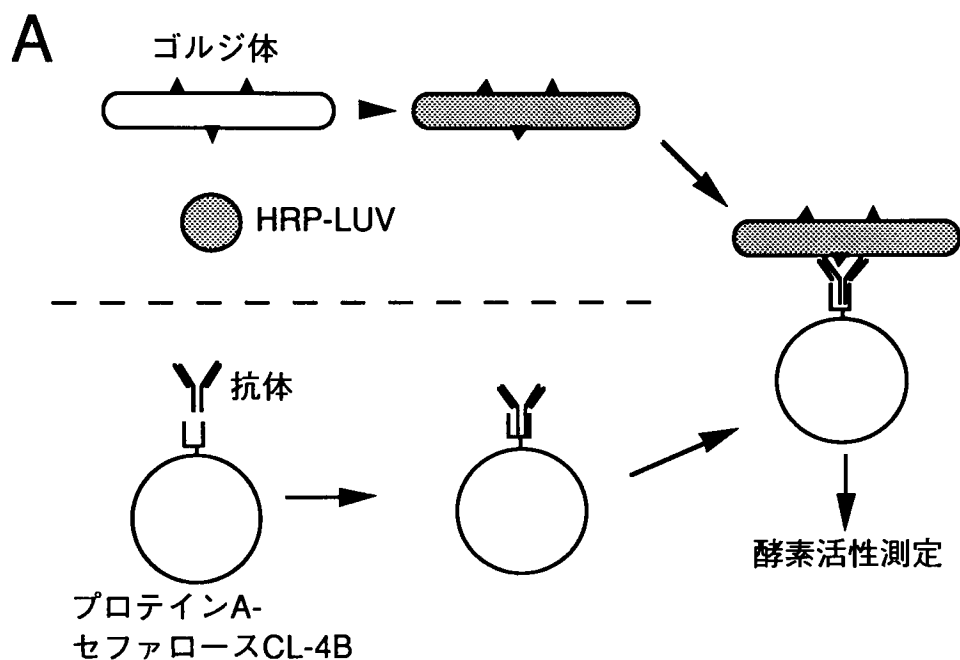


図3-3 モノクローナル抗体によるゴルジ体膜の沈降実験の模式図(A)と結果(B)。

ゴルジ体膜とHRP封入DOPC-LUVとを37℃、15分間インキュベーションした後、未反応のLUVを除いた。このゴルジ体膜を、抗体(C6A3または、mouseIgG)をプロテインAを介して結合させたセファロースCL-4Bビーズとインキュベーション(4℃、16時間)し、ビーズと共に回収できたHRP量を測定した。図は3回の測定の平均値±標準偏差で表してある。

### 3-4 脂質混合法によるゴルジ体膜とリポソームとの融合

前章までは、ゴルジ体膜とリポソームの融合を、リポソームに封入したHRPが、ゴルジ体膜に移行することを利用して測定した。この方法は、酵素活性を指標とするため高感度であるが、遠心操作や酵素活性の測定などの過程が必要なために、実際に融合がおきてから、それを測定するまでに最低でも2時間かかる。したがって、融合の初期過程の様子(融合の速度やインキュベーション後、何分ぐらいで融合が起きるのか)を見積るのが難しい。そのうえ、遠心操作や酵素活性の測定などが、融合活性に影響を与える可能性が大きい。特に遠心操作は、いったん融合した膜を壊し、内容物を漏出してしまう恐れがある。また、酵素活性の測定では、ゴルジ体膜と会合しただけで融合していないリポソームも融合したと見なしてしまうおそれがある。また、電子顕微鏡観察では定量性に乏しいうえに、固定、試料の切断などさらに多くの過程を必要とするので、恒常的なアッセイ法として使用するのは問題がある。

そこで、融合をリアルタイムで測定する手段として、2種の蛍光脂質間の共鳴エネルギー移動を利用した膜融合測定を試みた[Struck et al., 1981]。この方法はすでに、リポソーム同士の融合を測定するのに広く使われている。この目的のために、NBD-PEとR18という二種類の蛍光性脂質を、1.5 mol %ずつ含んだDOPCリポソーム(SUVとLUV)を作製した。リポソーム中で、NBDの蛍光スペクトルは、R18の吸収スペクトルと重なる部分が大きいため、励起状態のNBDのエネルギーは、R18を励起するために使われ、NBD自体が蛍光を発する確率が減る(共鳴エネルギー移動)。つまり、NBDの蛍光強度は、R18が存在しないときよりも、小さくなる。もしも、リポソームとゴルジ体膜の融合がおこり、両者の膜が混合すると、NBDに対するR18の濃度が希釈されるので、両蛍光脂質間の共鳴エネルギー移動が解消し、NBDの蛍光強度が増大する。この蛍光強度の増大を測定することで、膜融合の程度を評価できる(図3-4)。

(図3-5)は、脂質混合法による膜融合測定の結果である。Hepes 緩衝液中のゴルジ体膜(0.3 mg/mL)に、SUVを加えると、NBDの蛍光強度は速やかに増大し、5分後には最大値の20%に達した。SUVは曲率が大きく不安定なために、非特異的な融合を起こしやすいので、SUVの代わりに、LUVを使って融合を測定した。LUVを加えたときも、やはり、速やかな蛍光強度の増大が観察できたが、上昇の速度や程度は、SUV

よりも若干小さかった。

蛍光脂質を含まないDOPC100% SUVとDOPC/NBD-PE/R18 SUVとをインキュベーションしたところ、NBDの蛍光強度の増加はほとんど見られず、測定開始後、約3分後から、わずかに蛍光強度が上昇したに過ぎなかった。また、ゴルジ体膜の代わりに、ゴルジ体膜と同じタンパク質濃度のウサギ肝PNSを加えても、NBDの蛍光強度の顕著な増加は見られなかった(図3-5)。このことは、ゴルジ体膜とのインキュベーションの際に測定された蛍光強度の増加は、リポソームからの脂質の脱落や脂質交換タンパク質による蛍光性脂質の交換によるものではないことを示唆する。

(図3-6)は、測定時間を60分に延長した結果である。ゴルジ体膜とSUVをインキュベーションした場合、蛍光強度の増加しつづけていたが、増加の割合は低下していた。SUVとPNSをインキュベーションした場合は、ほとんど同じ割合で蛍光強度が増加し続けた。このことから、ゴルジ体膜に特異的な融合は約20分で完了したことが示唆される。

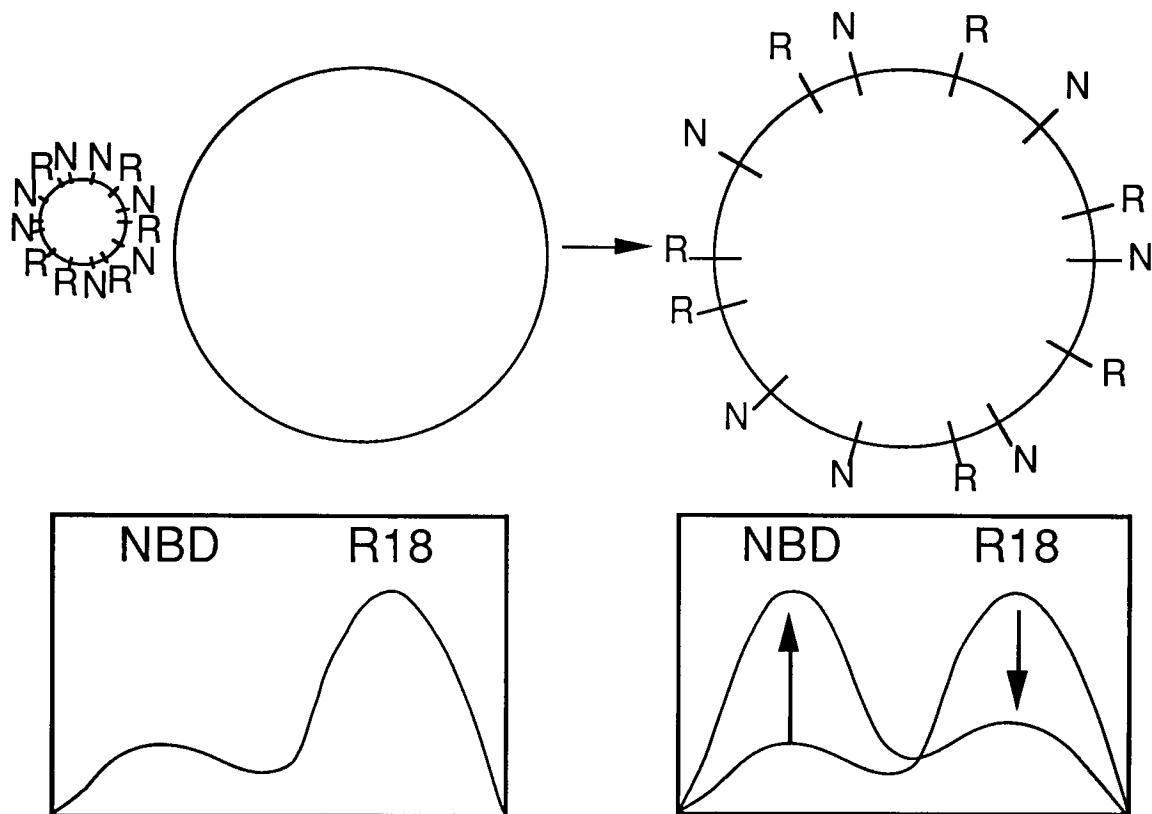


図3-4 脂質混合法測定概念図。

NBD-PE(N)とR18(R)を高濃度で含むリポソームを作ると、リポソーム内でNBDからR18への蛍光共鳴エネルギー移動が起こり、NBDの蛍光強度は低下する(図左)。膜融合に伴い蛍光性脂質が希釈されると、蛍光共鳴エネルギー移動が解消し、NBDの蛍光強度が増大する(図右)。

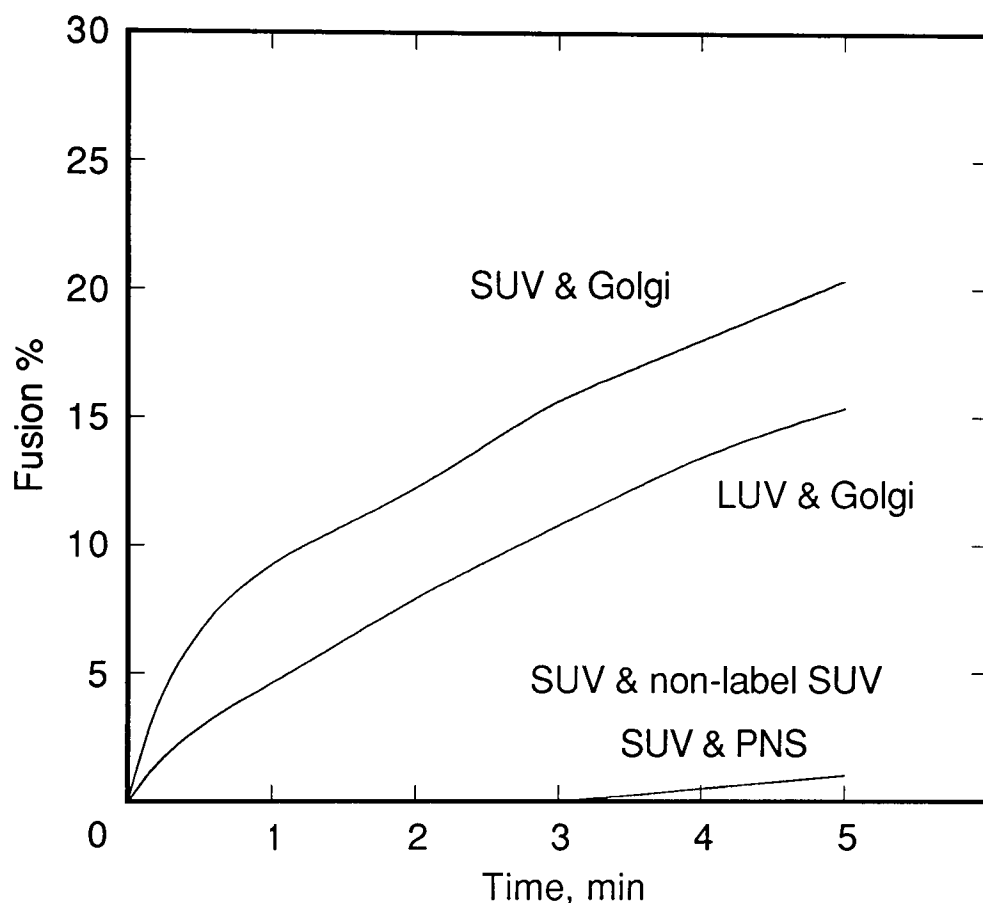


図3-5 脂質混合法で測定したゴルジ体膜とリポソームの膜融合。

ゴルジ体膜(0.3 mg/mL タンパク質濃度)をSUVまたはLUV(0.04 mM)とHepes緩衝液(145 mM 塩化カルシウム、5 mM Hepes pH 7.4)中で37℃で、励起波長470 nmでのNBDの530 nmの蛍光強度を測定した。また、非標識SUV(図中、non-label SUV; 0.04 mM)やPNS(0.3 mg/mL タンパク質濃度)とSUVとの膜融合も同様に測定した。膜融合活性(Fusion %)は、測定開始時のNBDの蛍光強度を0%、Triton X-100を添加して膜を可溶化した後の蛍光強度を100%として計算した。リポソームの脂質組成は、SUV、LUVともにDOPC/NBD-PE/R18 = 97/1.5/1.5(モル比)。非標識SUVはDOPC 100%。



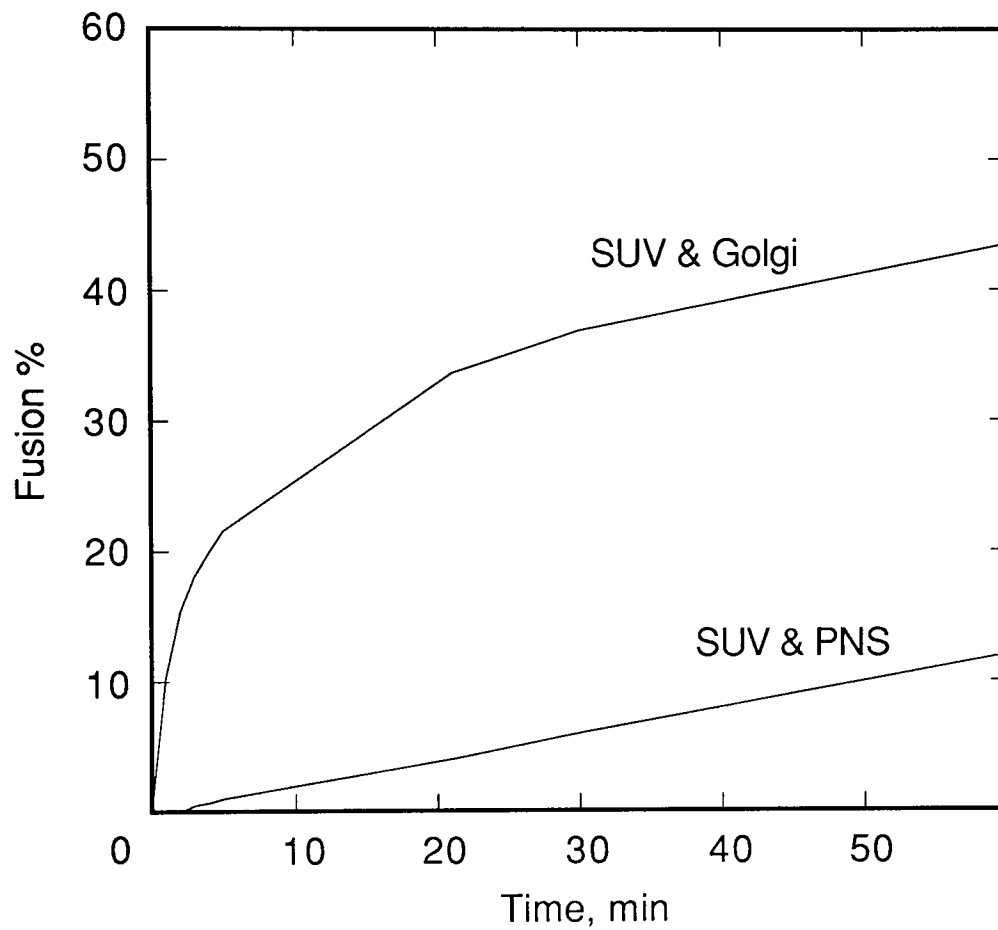


図3-6 脂質混合法で測定した、ゴルジ体膜とSUVとの膜融合。  
(図3-5)と同じ条件でゴルジ体膜とSUV, PNSとSUVとの膜融合を60分間測定した。  
SUV組成はDOPC/NBD-PE/R18 = 97/1.5/1.5(モル比)である。

### 3-5 SUVと他の膜分画との融合

3-2節でも触れたが、融合している膜がゴルジ体膜であることを脂質混合法を用いても確かめる必要がある。そこでゴルジ体膜を調製する際にできる他の膜分画(F1, F3)をゴルジ体膜と同じタンパク質量に合わせて、SUVとインキュベーションした。F1, F3ともに、若干の融合活性を示したが、ゴルジ体膜に比べると劣っていた(図3-7)。ウサギと同じ方法で、ラットの肝臓からゴルジ体膜を調製し、SUVとインキュベーションしてみた。蛍光強度の増大は見られたが、ウサギ肝ゴルジ体膜と比べると融合速度は遅かった(図3-7)。

ゴルジ体膜調製時に生じた各分画のガラクトシルトランスフェラーゼの活性(図3-1)とSUVとの融合活性、(図3-7)で5分後の値、を(図3-8)に表した。ガラクトシルトランスフェラーゼ活性と融合活性の間に相関があることがわかる。

これとは別に、ウサギの肝臓から、ショ糖密度勾配遠心法で形質膜や粗面小胞体膜、滑面小胞体膜を調製し、これらの膜とSUVとの融合活性を調べた。(図3-9)のように、形質膜や、粗面小胞体膜は測定開始後3分ぐらいから、蛍光強度の増大が見られたが、滑面小胞体膜は、5分後には、ゴルジ体膜と同程度の融合活性を示した。しかし、融合の速度とくに初速度は、ゴルジ体膜よりはかなり遅く、容易に区別できた。この結果から、滑面小胞体の融合が、ゴルジ膜の混入によると考えることはできる(滑面小胞体中でのゴルジ膜の濃度が薄いので、リポソームとの会合速度が低下しそれが全体の融合速度の低下につながると考えられる)が、その逆の可能性は低いといえる。F3分画の融合は、約3分後に緩やかに上昇し初めた点は、ゴルジ膜よりも滑面小胞体膜の融合に近かった。

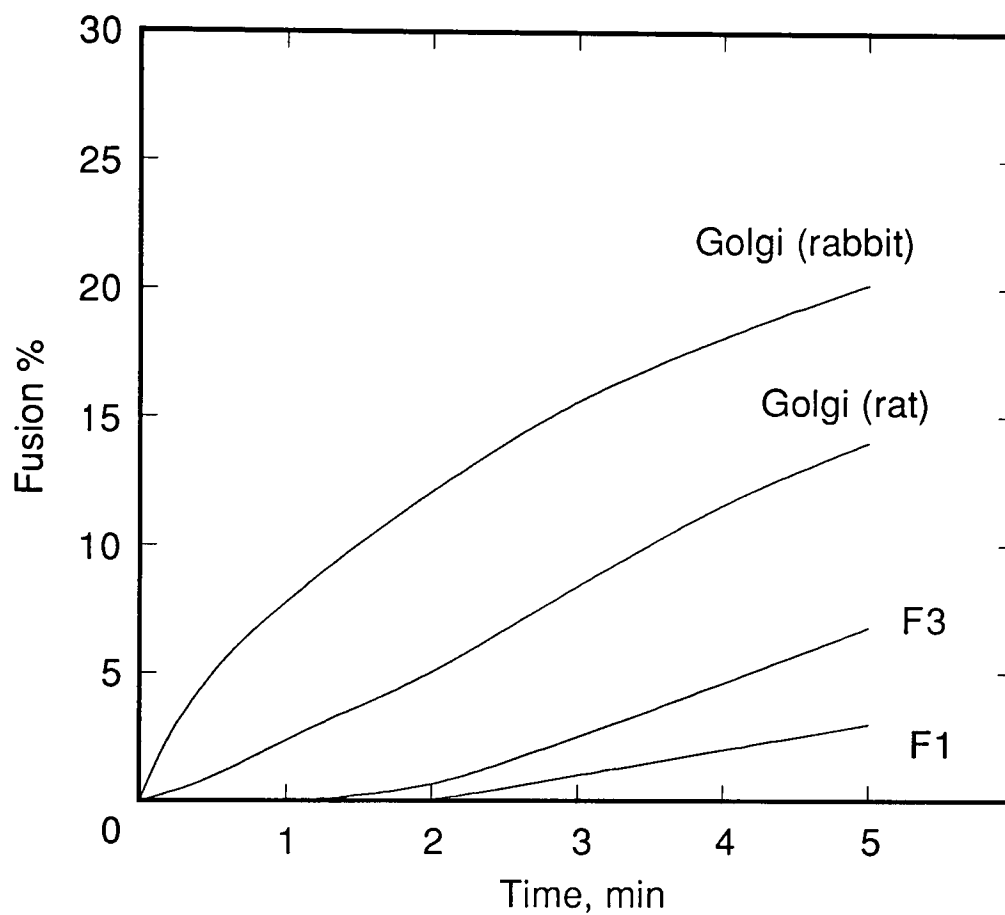


図3-7 脂質混合法で測定した、SUVと生体膜との膜融合。

SUV(0.04 mM)に対して、ウサギ肝ゴルジ体膜(図中、Golgi(rabbit))、ラット肝ゴルジ体膜(Golgi(rat))、F1、F3分画((図3-1)を参照)をそれぞれ、0.3 mg/mL (タンパク質濃度)を加えて(図3-5)と同様に膜融合を測定した。SUV組成はDOPC/NBD-PE/R18 = 97/1.5/1.5(モル比)。

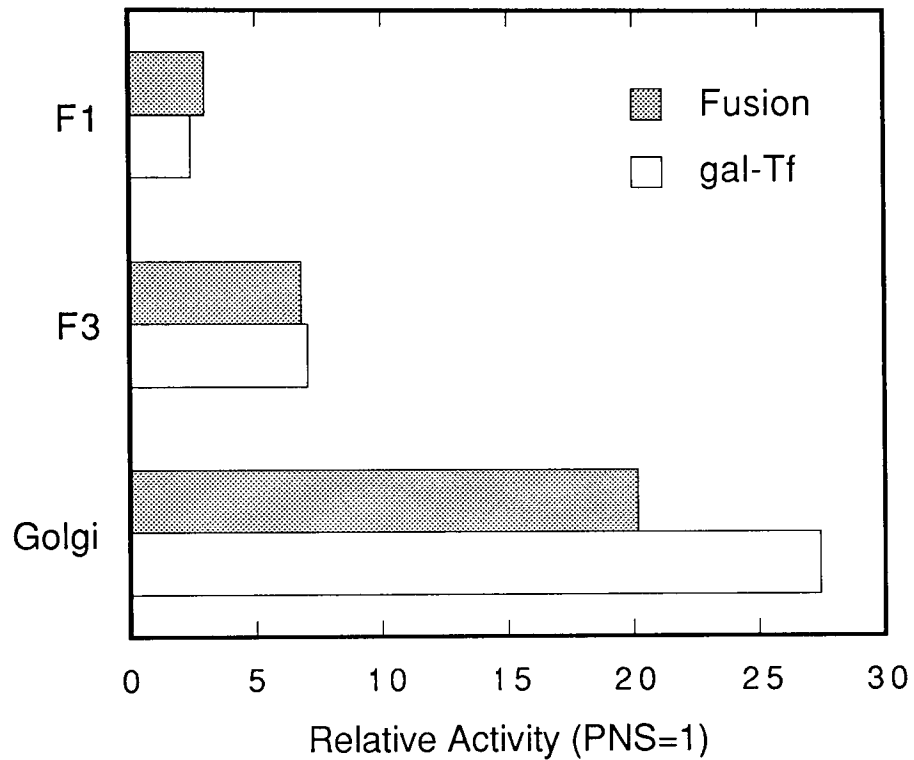


図3-8 ゴルジ体膜調製時に生じた膜分画の融合活性とガラクトシルトランスフェラーゼ活性との比較。

融合活性は、PNSとSUVの5分後の融合活性(図3-7)を1として、各分画の5分後の融合活性を示した。ガラクトシルトランスフェラーゼ活性は、(図3-1B)の値を再プロットした。

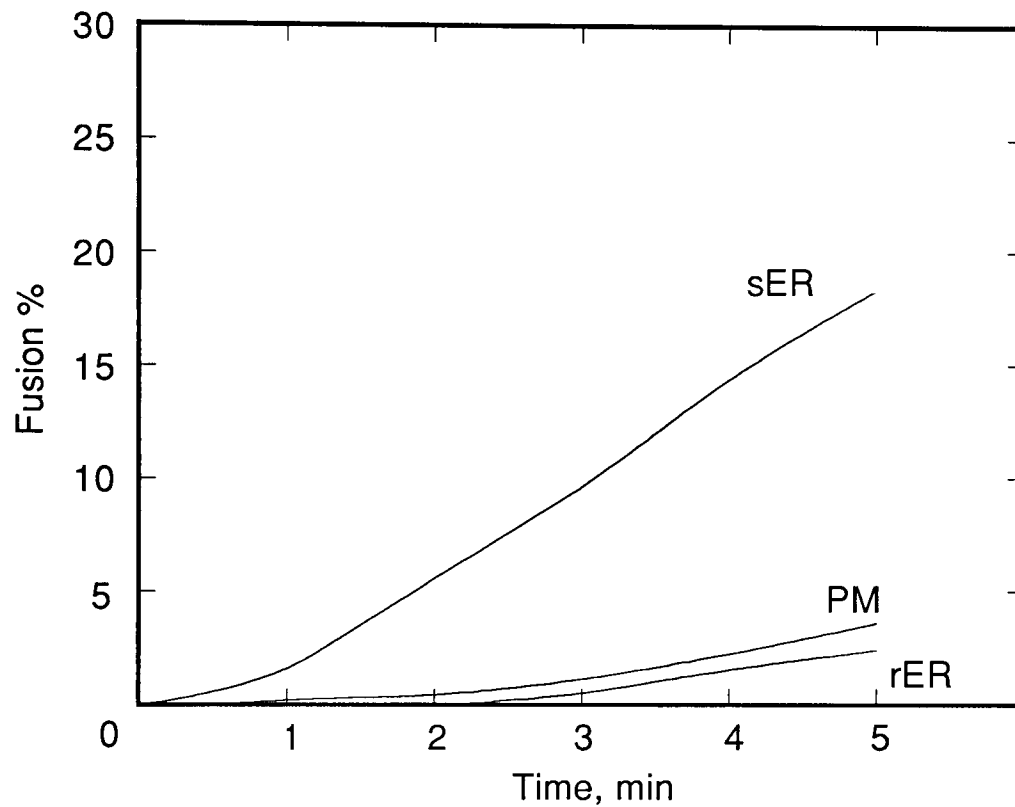


図3-9 各オルガネラ膜とSUVとの膜融合活性。

ゴルジ体膜と同じタンパク質濃度の、形質膜(PM)、粗面小胞体(rER)、滑面小胞体(sER)とSUV(DOPC/NBD-PE/R18 = 97/1.5/1.5, モル比)の膜融合を(図3-5)と同じ条件で測定した。形質膜、粗面小胞体、滑面小胞体はウサギの肝臓から調製した(2-4節参照)。

### 3-6 内水相混合法によるゴルジ体膜とリポソームとの融合

膜同士の脂質混合は、内容物が完全に混ざり合わなくても、会合するだけで起こりえる。融合を確認するためには、内水相の混合を測定する必要がある。すでに、3-2節で示したように、HRP封入LUVとゴルジ体膜をインキュベーションすると、HRPがゴルジ体膜に移行することを確かめた。しかし、脂質混合法の頃で述べたように、融合をリアルタイムで測定する必要がある。

そこで、LUVの内部に、FITC-デキストラン(平均分子量17,200)を高濃度(1.0 mM)で封入したLUVを使って、内水相混合法による膜融合の測定を試みた[Stutzin, 1986]。FITC-デキストランは、この濃度では自家消光する。自家消光の度合いは、濃度に依存するのでLUVがゴルジ体膜と融合し、FITC-デキストランがゴルジ体膜の内部に移行すると、FITC-デキストランの濃度が希釈され自家消光が解消し、蛍光強度が増大する。この蛍光強度の変化を測定し、融合の指標とした。この際、LUVからFITC-デキストランが漏出すると、FITC-デキストランの濃度がアッセイ溶液により希釈され、蛍光強度が増大してしまうので、融合活性を過大評価する恐れがある。これを防ぐために、アッセイ溶液中に抗FITC抗体を加えておき、LUV、または融合後のゴルジ体膜から漏出したFITC-デキストランの蛍光を消光するようにした。抗体の濃度は、界面活性剤で、膜を可溶化した後のFITC-デキストランの蛍光強度を完全に消失させるに十分な量にした。(図3-10)でTriton X-100添加後に蛍光が消失したことからも、そのことが確認できた。

内水相混合法の蛍光法による測定は、ANTS [Ellens et al., 1985]やテルビウム [Wilschut et al., 1980]の低分子を使った方法が一般的であるが、ゴルジ体膜には、糖やイオンを通過させるチャネルが存在するので、融合した後に低分子が漏出する可能性がある。このため、高分子のデキストランを使った内水相混合法を試みた。

(図3-10)が、実際の測定結果である。抗体存在下でも非存在下でもインキュベーション開始と共に蛍光強度は増大した。しかし、その程度は抗体存在下では、10%程小さかった。ここで観察された蛍光強度の差が漏出したFITC-デキストランの量に対応すると考えられる。この漏出が、膜融合中のものか、膜融合後のものかは判断できない。なお、融合の0%は、ゴルジ体膜を加える前の蛍光強度、100%は抗FITC抗体を加えずに、Triton X-100で膜を可溶化した後の蛍光強度である。また、FITCの蛍

光強度はpH依存的に変化するが、外液に塩化アンモニウムを加えゴルジ体膜内外の水素イオン勾配を破壊しても、融合測定に影響を与えなかった。

この測定法自身が抱える問題として、融合の0%と100%とを、同じ試料を使って求めることができない(前者が抗 FITC 存在化で測定するのに対し、後者は非存在化で測定しなければならない)。このため、融合の反応速度を求めることができるが、融合の程度の定量性に乏しくなる。この定量性に関する信頼性の欠如は、種々の試薬や処理が融合に及ぼす影響を比較する際に障害となる。したがって、今後の測定は原則として、脂質混合法で行うことにした。

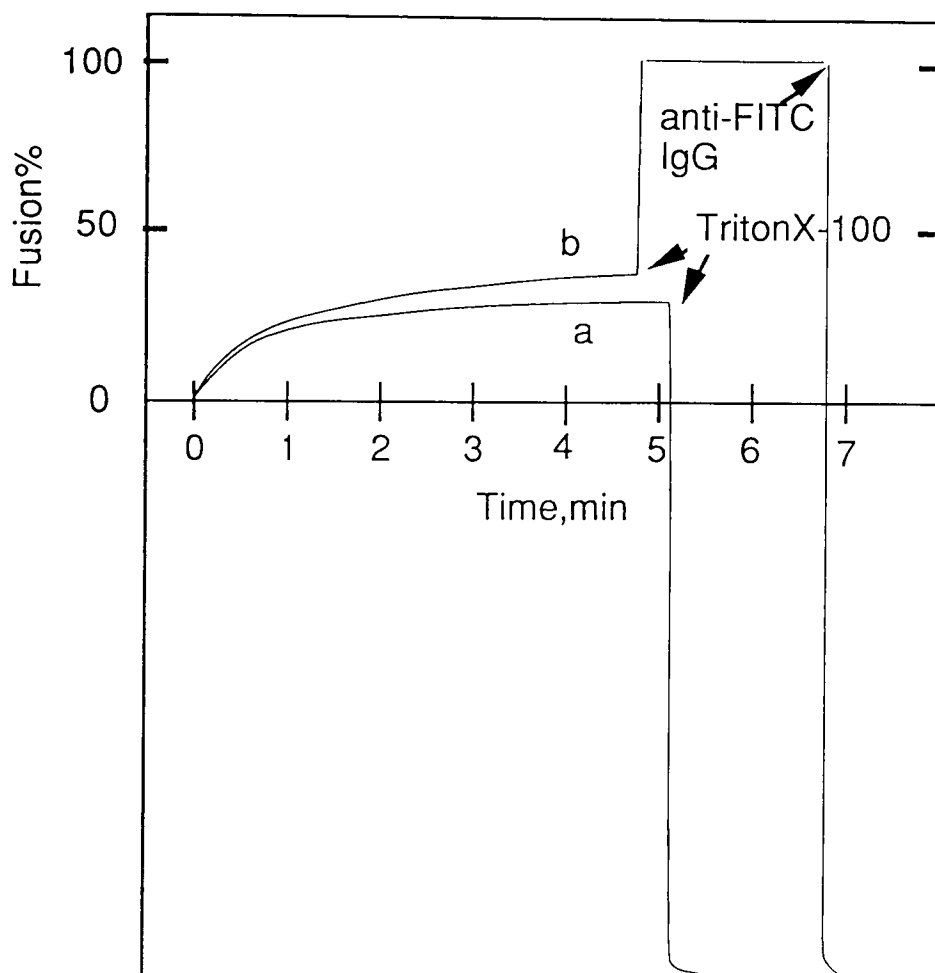


図3-10 内水相混合法によるLUVとゴルジ体膜との膜融合測定。

FITC-デキストラン(0.1mM)を含むDOPC LUV(0.04mM)をHepes緩衝液に加えインキュベーションし、Time = 0のときにゴルジ体膜(0.3mg/mL)を加え、37℃で、励起波長490nmでのFITCの530nmの蛍光強度の増大を測定した。(a)は、ゴルジ体膜を加える前に、アッセイ溶液中に抗FITC抗体(20  $\mu$ g/mL)加えておいたもの。(b)は、5分後にTrion X-100を加えて膜を可溶化した後に抗FITC抗体(20  $\mu$ g/mL)加えたもの。縦軸の膜融合活性(Fusion %)は、Time=0での蛍光強度を0%、(b)でTriton X-100を加えた後の蛍光強度を100 %とした。また、縦軸の最低値は、蛍光強度が0であることを示す。



### 3-7 ゴルジ体膜とリポソームとの融合に影響を及ぼす因子

#### a) イオン・低分子の影響

融合は、Hepes 緩衝液中で測定したが、塩化カリウムを塩化ナトリウムや炭酸ナトリウムに替えても、融合活性に影響はなかった。ところが、緩衝液を等張のショ糖-Hepes溶液(0.25M ショ糖、5mM Hepes, pH 7.4)にすると、融合はほぼ完全に阻害された。ショ糖濃度と融合との相関を調べると、(図3-11)のように、ショ糖濃度の増大に伴い融合は阻害された。等張の溶液を任意の比率で混ぜ合わせたのだから、浸透圧に変化はないはずであり、浸透圧が融合に影響を与えたのではない。

塩化カルシウム(1-5 mM)、Tris(10 mM)、両性イオン(Pipes, 5mM)を含む緩衝液を使用しても大きな変化はなかった。バリノマイシン( $10\mu\text{M}$ )・ナイジェリシン( $30\mu\text{M}$ )のなどのイオノフォアを加え、ゴルジ体膜内外のイオン勾配を破壊しても融合に影響を与えなかった。つまり、ショ糖による融合の阻害は、イオンの種類やイオン勾配というよりも、イオン強度が問題であるといえる。ただし、生理的意味は薄いですが、水素イオン濃度を上げると(溶液を酸性にすると)融合活性が増大した(約2倍)。

この阻害は、回復可能であり、ショ糖緩衝液でインキュベーションしたあとに、最終濃度150 mMの塩化ナトリウムを加え、イオン強度を上げると、融合が再開した(図3-12)。FITC-デキストランを使った内水相混合法でもショ糖緩衝液による阻害が起こった。この結果から、脂質混合法で融合を検出できなかった理由として、低イオン強度下では脂質の流動性が低下し、脂質の混合が起こらないためであるとか、NBD-PEやR18の蛍光強度などに影響を与えたためであるという可能性は否定される。

これまで、多くの、インビトロ細胞内膜輸送再構成で必要であると報告されたATP, GTPは融合に影響しなかった。ATP枯渇系(ヘキソキナーゼ(10 U/mL)とグルコース(5mM)の混合液)やGTPの非加水分解性アナログのGTP $\gamma$ S( $10\mu\text{M}$ )を使って、ゴルジ体分画に含まれる内在性のATPやGTPの影響を取り除いても、融合活性は変化しなかった。WGA, ConA(ともに $10\mu\text{g/mL}$ )などのレクチンも影響を与えなかった。レクチンが糖鎖に結合し、タンパク質や脂質の糖鎖は、ゴルジ体内腔で付加されることを考えれば、これは当然の結果であるが、逆に言えば、これは、裏返しになったゴルジ体膜上のタンパク質が融合に関与していないことを示唆する。

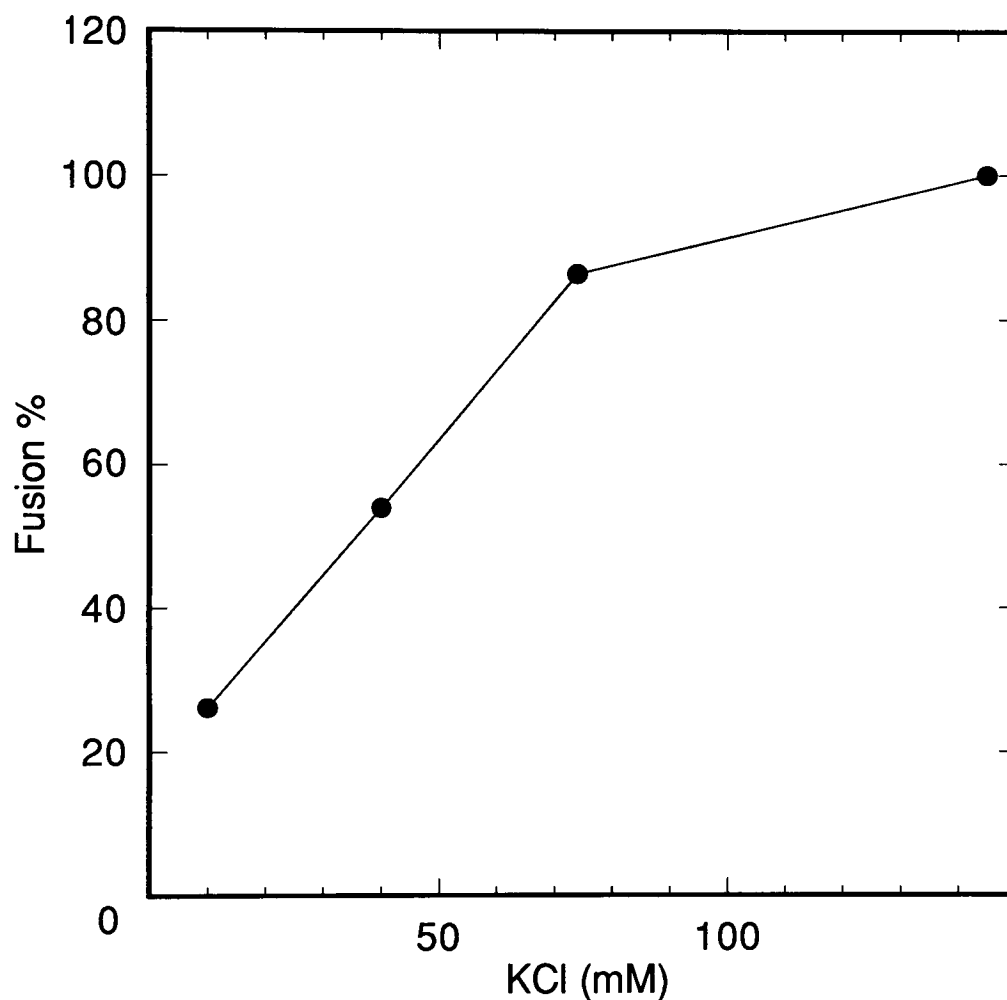


図3-11 ゴルジ体とSUVの膜融合に対するイオン強度の効果。

Hepes緩衝液(145 mM塩化カリウム、5 mM Hepes pH 7.4)とショ糖-Hepes緩衝液(0.25Mショ糖、5mM Hepes pH 7.4)とを最終の塩化カリウム濃度が図で示した値になるように混合した。このように調製した緩衝液を使って、(図3-5)と同様にゴルジ体とSUVとの膜融合を測定した。図は、塩化カリウム濃度が145mMのときの膜融合活性を100%として表してある。

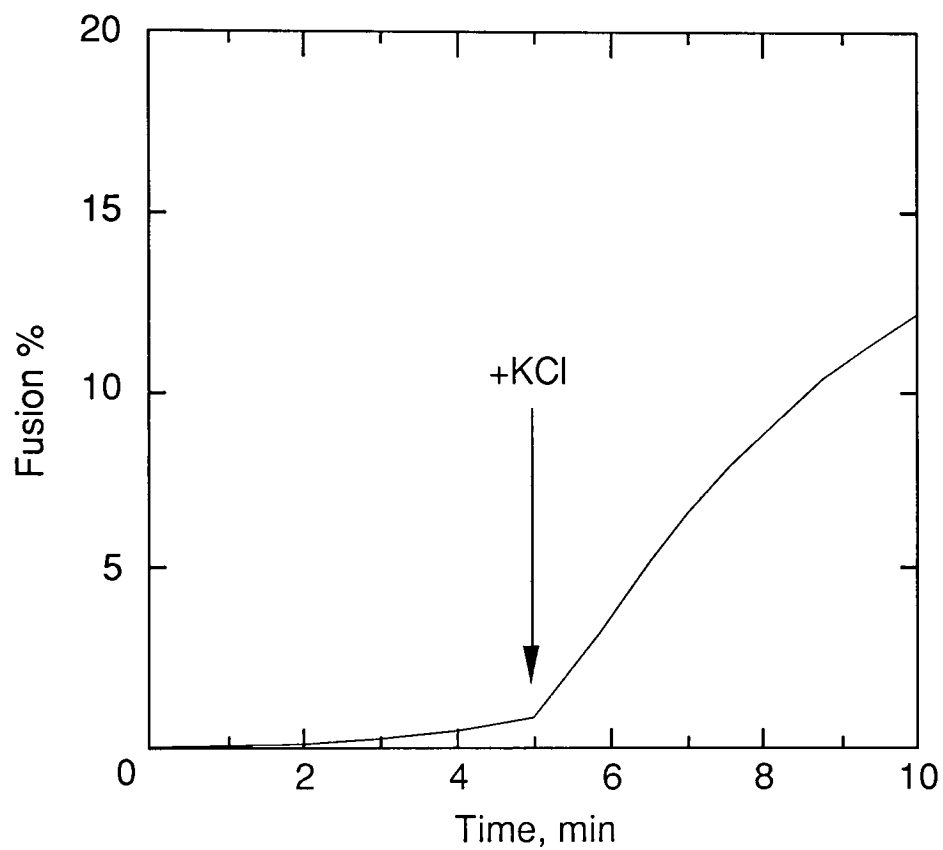


図3-12 ゴルジ体膜とSUVとの膜融合活性のイオン強度依存性。

ゴルジ体とSUVとの膜融合をシヨ糖-Hepes緩衝液(0.25Mシヨ糖、5mM Hepes, pH 7.4)で(図3-5)と同様に測定し、5分後に最終濃度が145mMになるように塩化カリウムを加え(図中、矢印で示してある)、さらに5分間測定した。

#### b) タンパク質の影響

ゴルジ体膜を高塩濃度の溶液(1.0M塩化カリウム)で処理したり、アルカリ処理をして、ゴルジ体膜表面のタンパク質を取り除いても融合は観察された。ゴルジ体膜をトリプシン・プロテアーゼ K で処理すると活性が半減した(図3-13)。ただし、サーモリシンでは活性は2/3程度にしかならなかった。また、アルカリ処理後にトリプシン処理すると、単にトリプシン処理しただけよりも、SUVとゴルジ体膜の融合の阻害の程度は大きかった(対照の30%程度になった)。ゴルジ体膜をタンパク質のアルキル基の修飾剤であるNEM処理してもほとんど影響しなかった。ウサギの肝臓のPNSを高速度で遠心し(10,000 g)で膜成分をほとんど除去し、細胞質タンパク質を集めたものをアッセイ溶液に加えても(最終濃度 1 mg/mL)融合に影響しなかった。これらの結果は、細胞質タンパク質や、膜表在性タンパク質ではなく、ゴルジ体膜に存在する内在性タンパク質が融合に関与することを示唆する。

#### c) 温度依存性

インキュベーション温度を下げると融合活性は、温度の減少に連れて減少した(図3-14)。そして、10℃以下ではほとんど測定できなかった。ただし、DOPCの相転移温度は-22℃なので、この温度範囲ではDOPCの相転移は起こらない。

#### d) リポソームの濃度と融合との関係

SUVの濃度を下げると融合活性は増大した(図3-15)。しかし、実際に融合したリポソームの量を見積るとほとんど変化はなかったので、すでに飽和していると考えられる。また、融合が、リポソームによるゴルジ体膜の凝集によるものでないことがわかる。

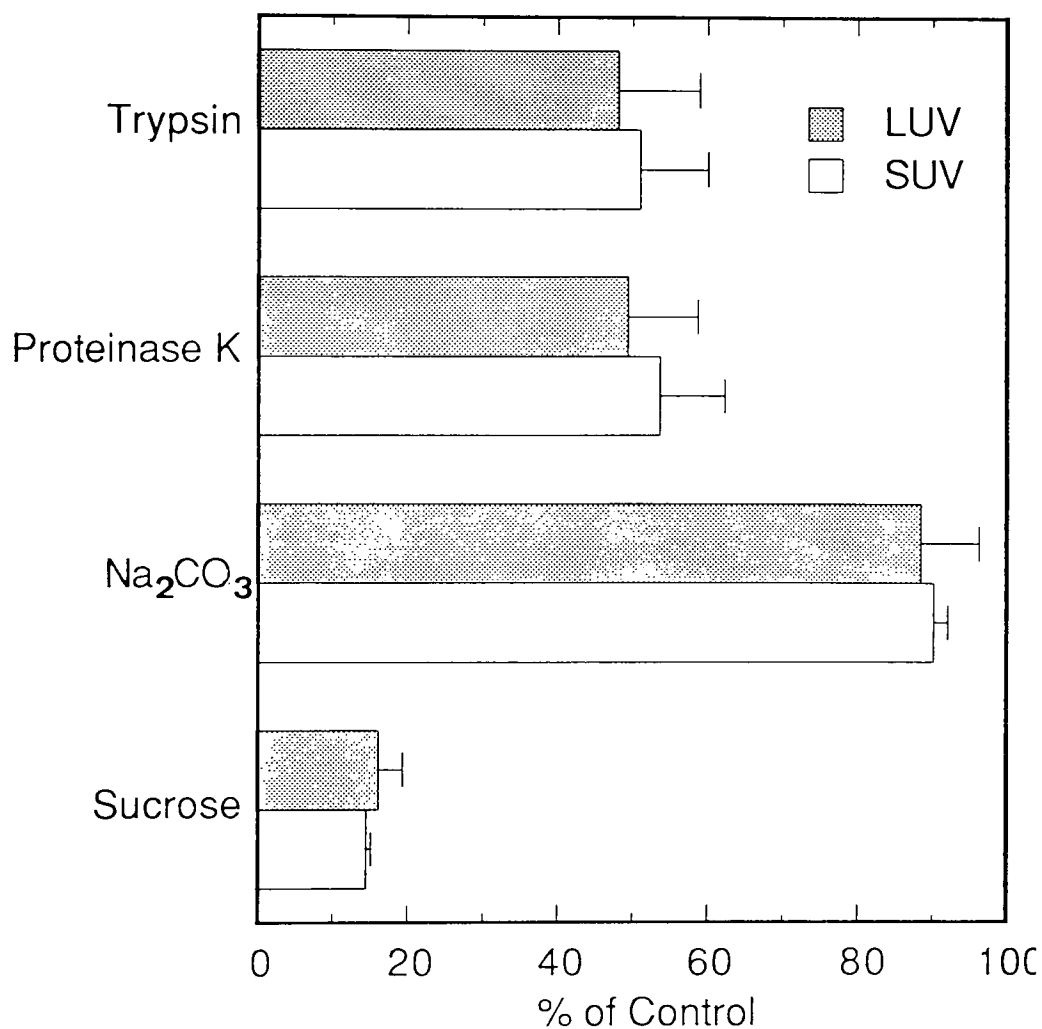


図3-13 ゴルジ体膜とリポソームの膜融合に対する、さまざまな処理の効果。

ゴルジ体膜をトリプシン(図中 Trypsin; 10  $\mu$ g/mL)、プロテイナーゼK(図中 Proteinase K; 1  $\mu$ g/mL)または炭酸ナトリウム(図中 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 0.1 M)中で 4  $^{\circ}$ C、30分間インキュベーションし、(図3-5)と同じ条件でSUVまたはLUVの融合を測定した。また、アッセイ緩衝液をショ糖-Hepes緩衝液に変えたとき(図中 Sucrose)の膜融合活性も測定した。対照実験での測定開始後5分の膜融合活性を100%として、各条件での5分後の融合活性の平均値 $\pm$ 標準偏差(3回の測定)を表してある。

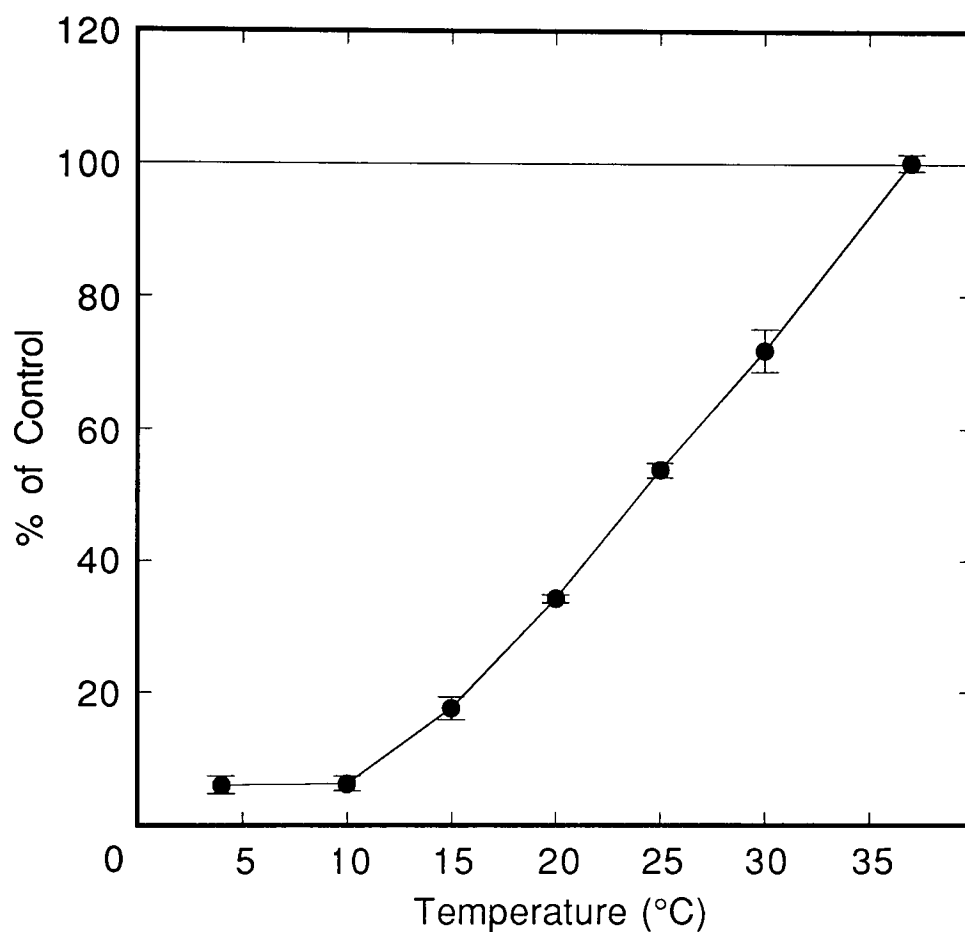


図3-14 ゴルジ体膜とSUVの膜融合の温度依存性。

膜融合活性は(図3-5)と同様に測定した。ただし、アッセイ溶液の温度を図に示すように変化させた。このとき、SUVを加える前のアッセイ溶液をあらかじめ測定温度でインキュベーションしておいた。図は、37°Cでの膜融合活性の平均値を100%として、各温度での融合活性の平均値±標準偏差(測定回数3回)を表してある。

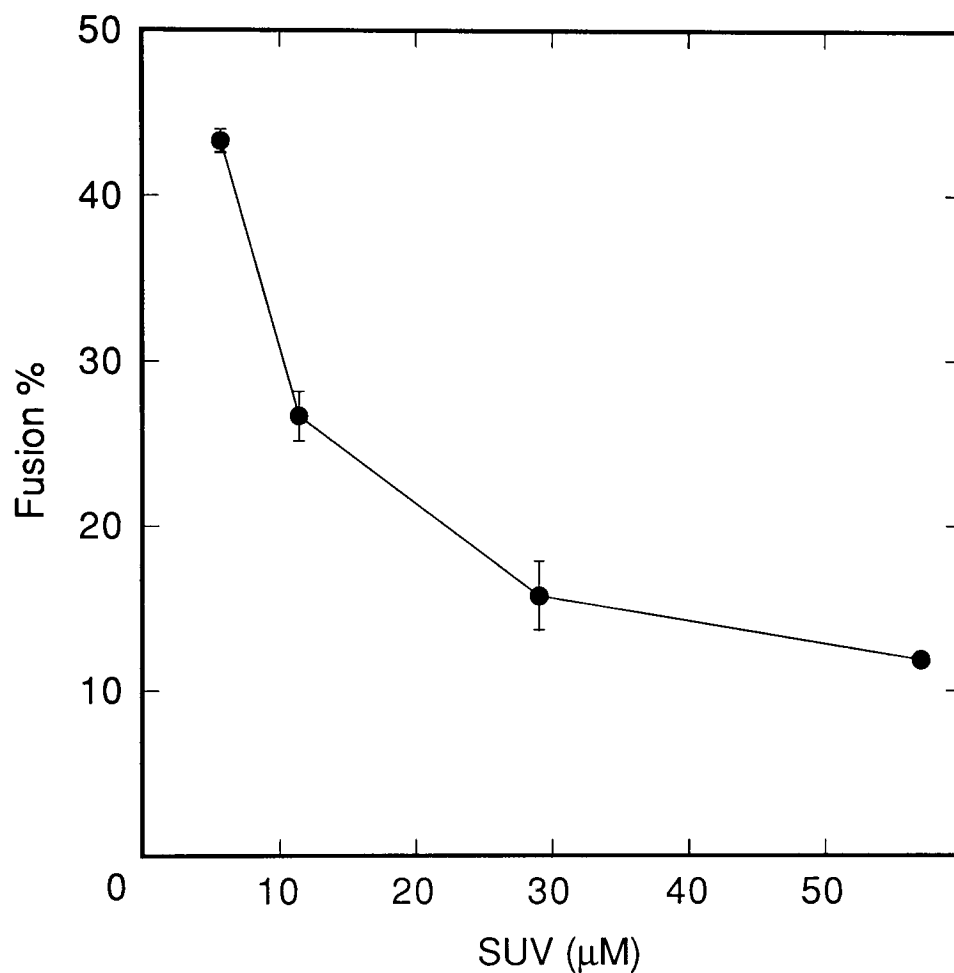


図3-15 ゴルジ体膜とSUVとの膜融合活性のSUVの濃度依存性。

ゴルジ体膜とSUVとの膜融合を(図3-5)と同じ条件で測定した。このときSUVの濃度を図に示したように変化させた。図は測定開始後5分の膜融合活性(Fusion %)の平均値±標準偏差(3回の測定)をSUVの濃度に対してプロットしてある。

### 3-8 ゴルジ体膜とSUVの会合量の測定

脂質混合法による融合の測定では、会合しているが融合していない状態を調べることはできなかった。そこで、会合したリポソームの全体量を見積ることにした。リポソームとゴルジ体膜は脂質混合法のときと全く同様にしてインキュベーションした後、0.5 M- 1.2 Mの連続ショ糖密度勾配の上に乗せ遠心し、分画した。各分画のタンパク質濃度を、280 nmの吸光度(トリプトファン残基の量、すなわちタンパク質量に対応する)、ショ糖濃度、 $\alpha$  マンノシダーゼ活性およびR18の蛍光強度を測定した。蛍光強度の測定の際には、あらかじめ、TX-100で膜を可溶化し、蛍光共鳴エネルギー移動やゴルジ体膜の光散乱の影響を最小限にするようにした。(図3-16)からわかるように、リポソームのピークは軽い分画と重い分画(ショ糖濃度0.8 M付近)の2つある。軽い方は、ゴルジ体膜と会合しなかったリポソームを示すことがわかる。重い方は、タンパク質のピークやマンノシダーゼ活性のピークと一致するので、ゴルジ体膜と会合または融合したリポソームに対応すると考えられる。

この方法では、ゴルジ体膜と会合したリポソームの量を定量的に求めるのは難しい。なぜなら、分画の仕方に多少ばらつきがあるし、どの分画をゴルジ体膜と会合したリポソームと見なすか難しいからである。(図3-16)から明らかなように、リポソームのピークは重いほうには一つしかなく、ゴルジ体膜とリポソームとの会合状態に密度が異なる複数の構造体が存在しない(存在したとしても、この方法では分離できない程の密度差しかない)と考えられるので、測定をより簡略にし、なおかつ、定量性に信頼性をもたせるため、会合測定法を(図3-17)に示すように改良した。インキュベーション後に、会合しなかったSUVとゴルジ体膜とを分離する際に、連続密度勾配の代わりに、0.5 Mと1.0 Mの2層からなるショ糖密度勾配を使うことにした。遠心後には、0.5 Mと1.0 Mの界面にゴルジ体膜が濃縮される。ゴルジ体膜だけを回収しようとする、回収率に差が生じるので、試料は単純に等分割し軽いほうの試料には、ゴルジ体膜と結合しなかったリポソームが来るように、重いほうにはゴルジ体膜がすべて集まるようにした。

低温やショ糖-Hepes緩衝液でのインキュベーションでは脂質の混合は、ほぼ完全に阻害されたにもかかわらず、SUVがゴルジ体膜の会合は対照と変わりなかった。ゴルジ体膜をプロテアーゼ処理した場合は、会合は融合と同程度に阻害された(図3-18)。

会合の時間依存性を調べた。この場合、4℃でも反応を停止することができないので、会合測定法を一部変更した。反応を停止させるために、最終濃度10 mg/mLの



ウシ血清アルブミンをアッセイ溶液に加えたのである。ウシ血清アルブミンは、リポソームとの親和性が大きく、リポソームがゴルジ膜に結合するのを立体的に阻害したからである。(図3-19)に会合の時間依存性の結果を示す。(図3-5)と比較すれば明らかだが、会合は融合に比べて速く起こることがわかった。

なお、会合を測定した範囲では、NBDの蛍光強度とNBDの量は比例していた。

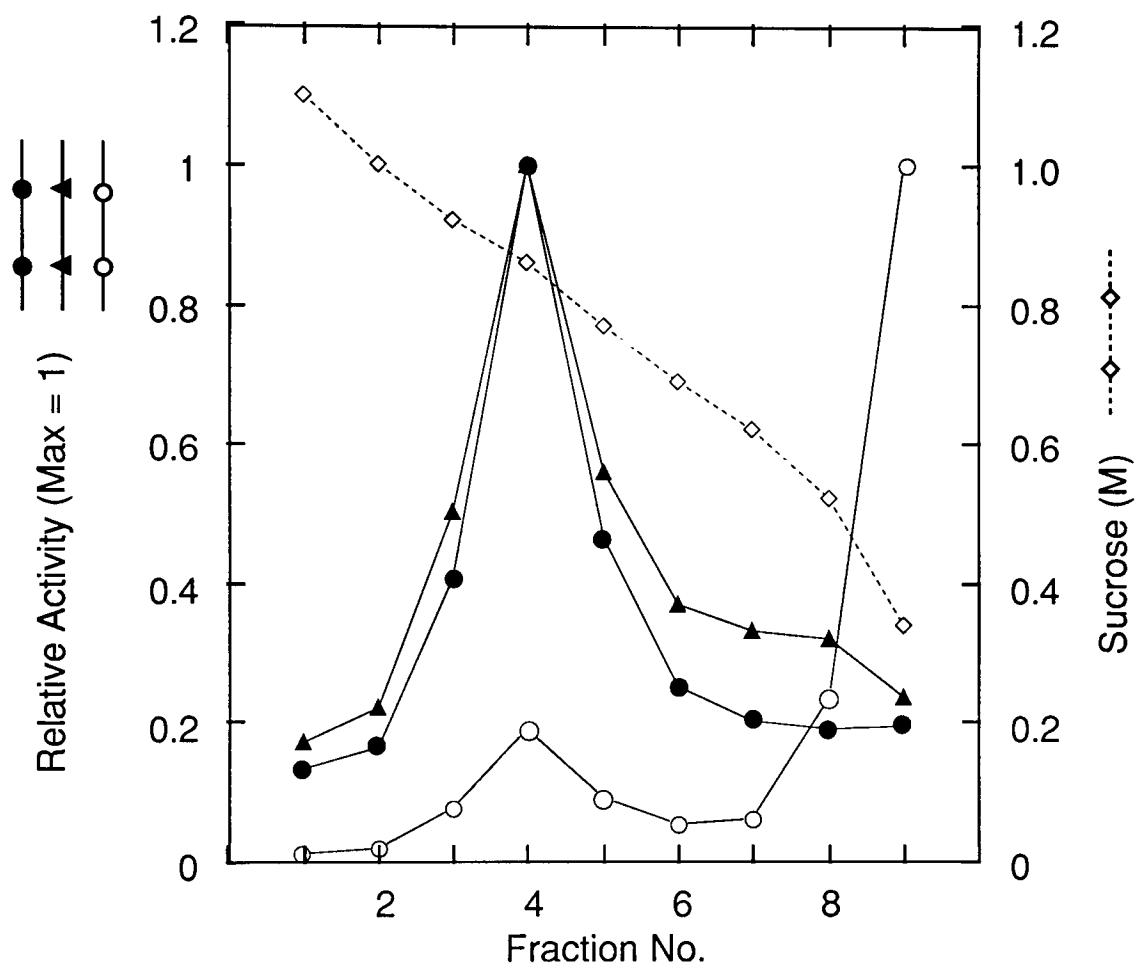


図3-16 ゴルジ体膜とSUVのショ糖密度勾配による分離。

ゴルジ体膜(0.3mg/mLタンパク質濃度)とSUV(0.04mM)をHepes緩衝液中で37℃、5分間インキュベーションした後、0.5M-1.2Mのショ糖連続密度勾配遠心で分離し、500  $\mu$ lずつ分画した。各分画の280nmの吸光度(▲)、 $\alpha$ -マンノシダーゼ活性(●)、R18の蛍光強度(○)、ショ糖濃度(◇)を測定した。ショ糖濃度はモル数(右)で、他の測定値は最大値を1として計算し(左)表した。SUV組成はDOPC/NBD-PE/R18 = 97/1.5/1.5(モル比)。

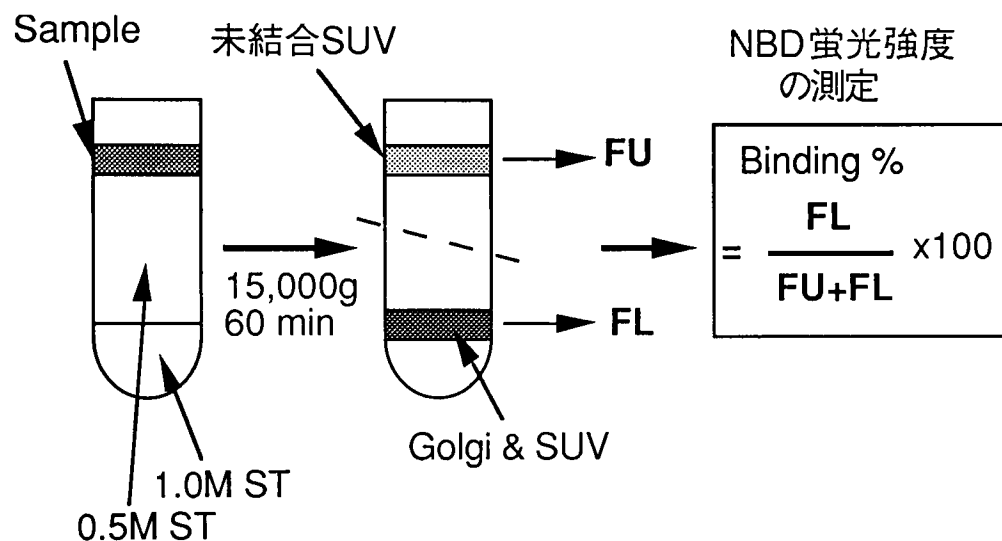


図3-17 ゴルジ体膜とSUVとの会合測定法の模式図。

ゴルジ体膜とSUVとを(図3-5)と同じ条件で37℃、5分間インキュベーションした後の試料(Sample)を図に示したようなショ糖勾配の上に乗せて遠心し、上と下の分画に等分した。各分画にTriton X-100を加えて膜を可溶化した後、NBDの蛍光強度を測定し、図に示した式で会合の程度を見積った。

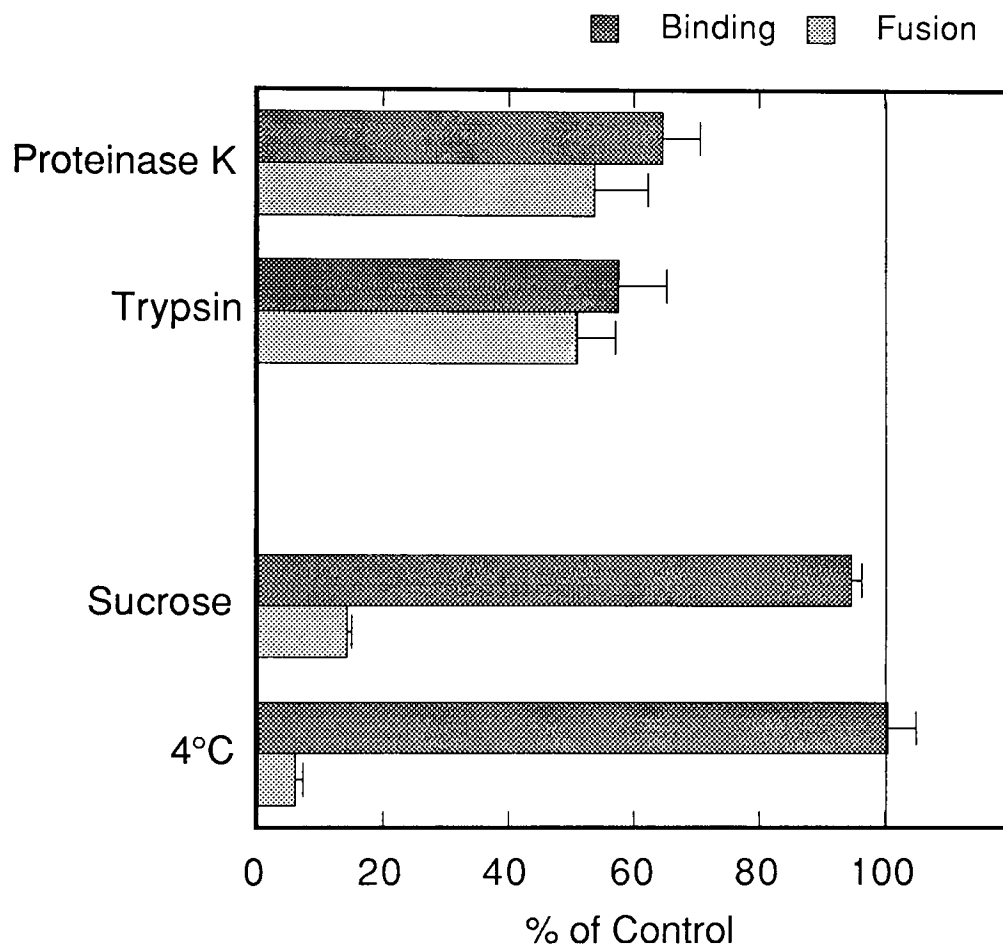


図3-18 ゴルジ体膜とSUVの会合測定。

(図3-17)の方法でゴルジ体膜とSUVとの会合を測定した。ゴルジ体膜はトリプシン(図中 Trypsin;  $10 \mu\text{g/mL}$ )、プロテイナーゼK(図中 Proteinase K;  $1 \mu\text{g/mL}$ )  $4^\circ\text{C}$ 、30分間インキュベーションした。また、Hepes緩衝液をシヨ糖-Hepes緩衝液に置換した場合(図中 Sucrose)や、 $4^\circ\text{C}$ での測定が与える影響を調べた。結果は、対照を100%として、各処理での会合量の平均値 $\pm$ 標準偏差(3回の測定)で表してある。比較のために、各処理での膜融合活性を、対照を100%として、平均値 $\pm$ 標準偏差(3回の測定)で併記してある。

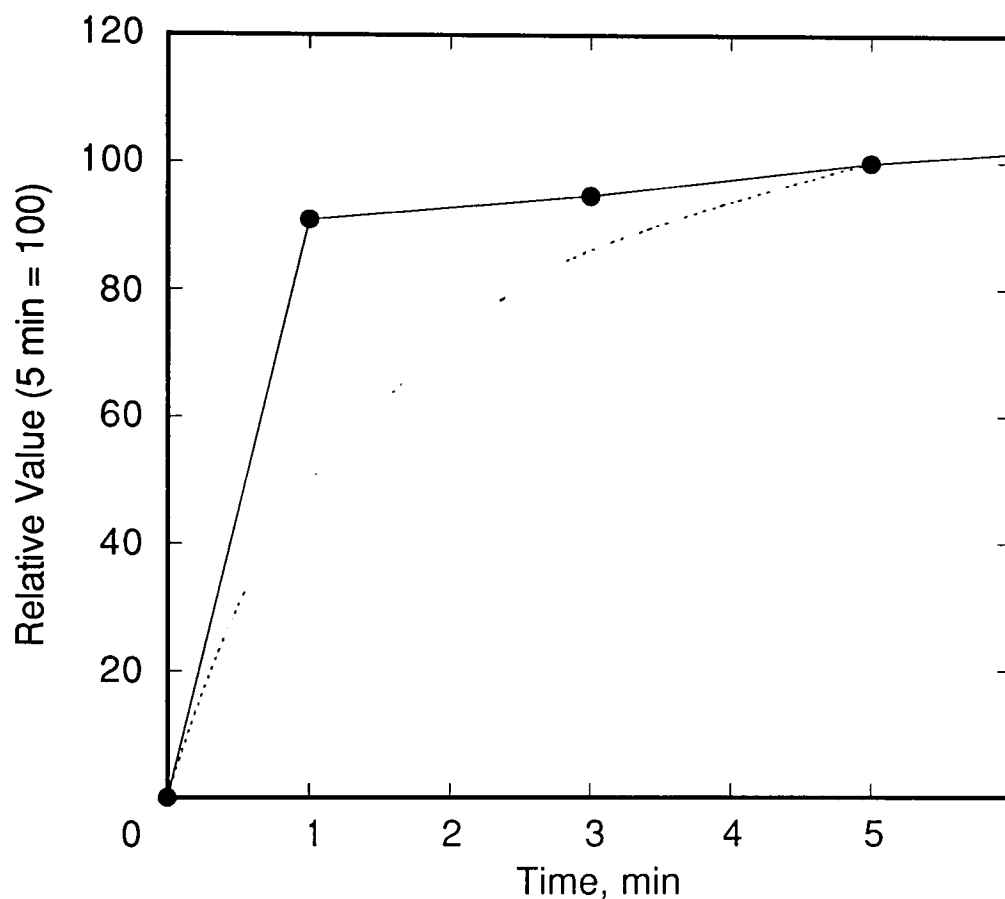


図3-19 ゴルジ体膜とSUVの会合の時間依存性。

ゴルジ体膜とSUVとを(図3-5)の条件で一定時間インキュベーションした後、ウシ血清アルブミンを最終濃度10mg/mLになるように加え、反応を停止させた。会合の程度は、(図3-17)の方法で測定した。反応時間0分での会合量を0として、5分間インキュベーションしたときの会合量を100として、プロットした。比較のため、脂質混合法によるゴルジ体膜とSUVの膜融合の時間依存性(5分後の値を100)を破線で示した。

### 3-9 脂質組成

これまでの実験で使用したSUVもしくはLUVの脂質は、蛍光脂質以外はすべて中性リン脂質のDOPCであった。DOPCのアシル鎖は二本ともオレイン酸とのエステル結合により生成する。オレイン酸は、炭素数18で、二重結合が一つ含まれる不飽和脂肪酸である。したがって、DOPCリポソームのみで融合を測定した場合、脂質の電荷や脂質のアシル鎖の影響を調べることができない。そこで、SUVの脂質組成を(図3-20)に示したように変え、各々について、融合(脂質混合法)と会合活性を調べた。

PSやPEが、含まれると融合活性は約2倍に増大した。PSによる活性の増大は、内水相混合法でも確認された。コレステロールを加えると、会合には変化はなかったが、融合の程度はDOPCのみに比べて、60%程になった。卵黄PCは、会合・融合ともに活性が減少した。PS,PEでは融合・会合の程度に差がなかったが、卵黄PC,コレステロール/DOPCでは、差が見られた。PSは負の電荷をもち、PS(牛脳由来)、PE(卵黄由来)、卵黄PCは天然脂質なので、リン脂質のアシル鎖の長さや飽和度がさまざまであり、これらが融合を阻害することはなかった。この結果は、これまで測定してきた融合がDOPCに特異的な融合というわけではなく、より普遍的な現象であることを示唆する。

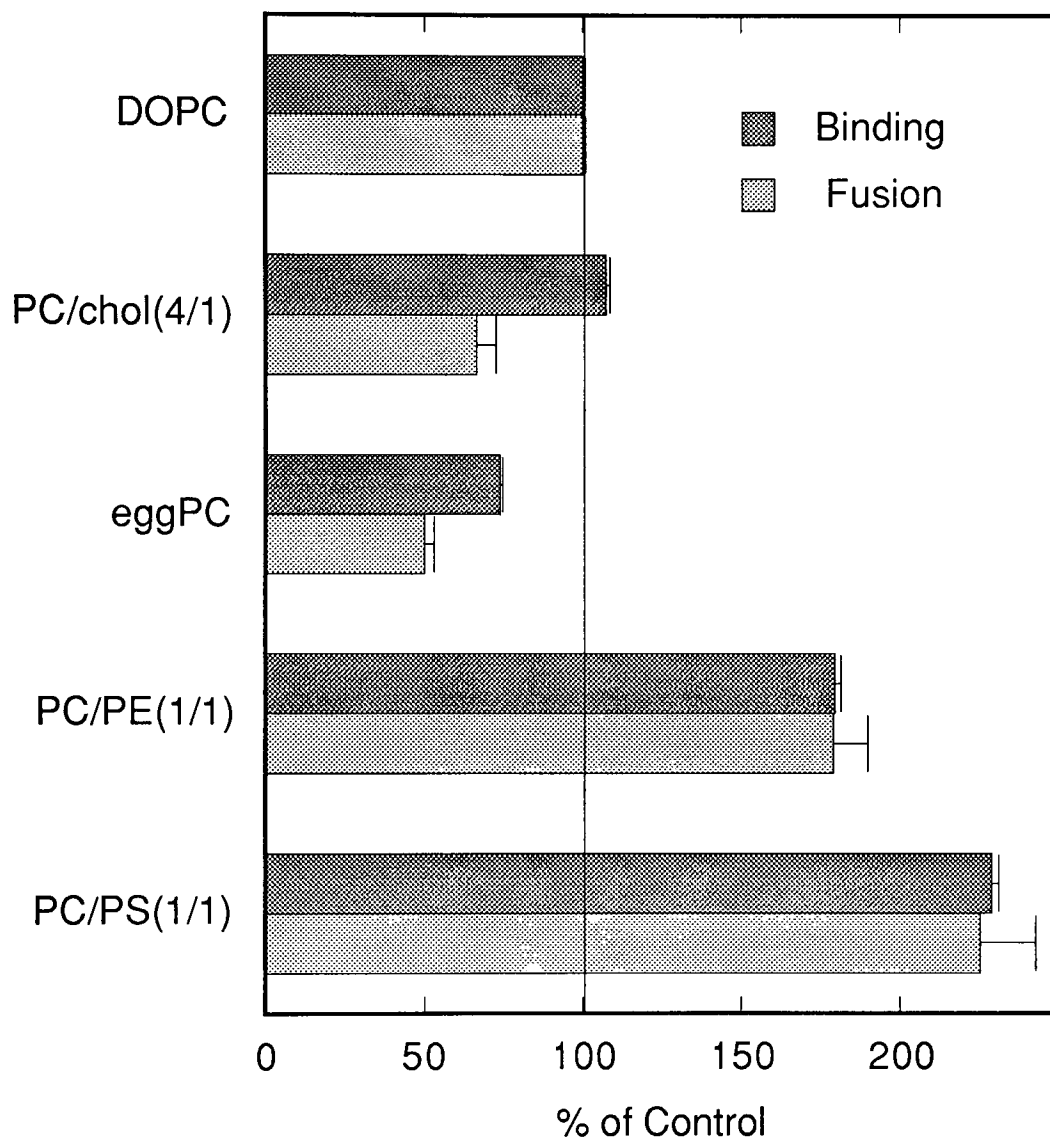


図3-20 SUVの脂質組成がゴルジ体膜との融合に与える影響。

膜融合の測定は、(図3-5)と同様に測定した。SUVは、図に示した組成(モル比で示してある)で脂質を混合し、脂質/NBD-PE/R18 = 97/1.5/1.5 となるように蛍光性脂質を加えて作成した。会合(Binding) 融合(fusion)ともにDOPCの活性の平均値を100%として、それぞれのSUVの活性の平均値±標準偏差(3回の測定)を表してある。図中、eggPCは卵黄PC, cholはコレステロールを示す。

### 3-10 モノクローナル抗体C6A3の性質

抗体は、本研究で使用したラットゴルジ体分画を抗原として、マウスから得たもので、NRK細胞の核周辺領域を特異的に染色した(図3-21A)。この染色パターンは、ゴルジ体に特徴的であるが、さらに、その可能性を確かめるために、細胞を微小管重合阻害剤(ノコダゾール) [Thyberg & Moskalewski, 1985]やブレフェルジンA [Lippincott-Schwartz, 1991]などの、ゴルジ体の形態に大きな影響を及ぼす試薬で細胞を処理し、抗原の細胞内局在の変化を調べた。その結果、ノコダゾール処理した細胞では、C6A3による染色パターンは核周辺から、細胞質全体に広がる粒状の構造体になった(図3-21B)。一方、ブレフェルジンAで処理した細胞では、C6A3は、蛍光顕微鏡で識別できるような構造を認識しなかった。この結果から、C6A3の抗原は、NRK細胞のゴルジ体に存在している可能性が大きい。このような、ゴルジ体特異的な染色パターンは、ラットの免疫組織染色でも膵臓外分泌部の腺細胞 耳下腺腺房細胞・導管細胞・腎臓糸球体細胞・小腸上皮細胞のゴルジ体と思われる領域に一致して非常に明瞭に出現した。肝臓実質細胞・腎臓遠位尿細管上皮細胞には弱いながら認められた。膵臓のランゲルハンス島の細胞には出現しなかった。電子顕微鏡観察では、膵臓外分泌細胞のゴルジ層板に出現していたが、陽性部がどの層板かはわからなかった。

抗原は、ウエスタンブロッティング法では推定できなかったが、免疫沈降により、47kDaと200kDaのタンパク質と推定した。また、この抗体は、ヒトKB細胞のブレフェルジンA耐性株[Seguchi et al., 1992]の耐性度が減衰するときに現われる200kDaタンパク質を認識することがわかった。

C6A3のエピトープがゴルジ膜の細胞質側にあることは、単離したゴルジ体膜を使った間接蛍光抗体法から推定した[Murata et al., 1992b]。



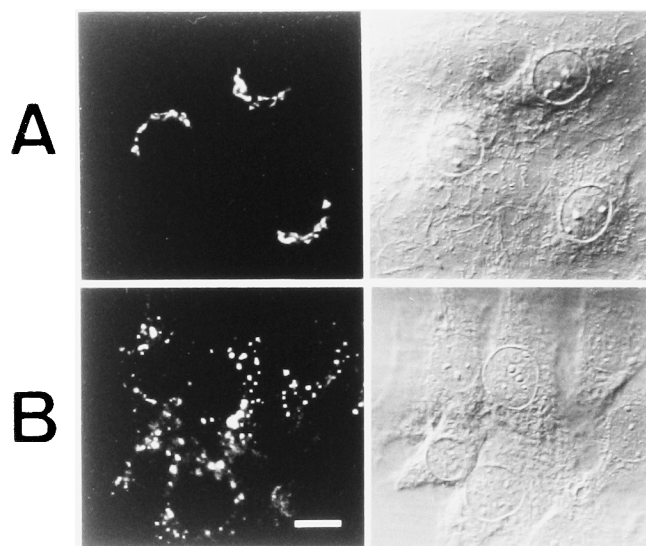


図3-21 モノクローナル抗体C6A3により染色したNRK細胞の蛍光(左)およびノマルスキー(右)顕微鏡写真。

NRK細胞は、 $10\mu\text{g/mL}$  のノコダゾール存在化(B)、または非存在化(A)で $37^{\circ}\text{C}$ 、60分間インキュベーションした後、メタノールで固定した。ブロッキングは1%のウシ血清アルブミンを含むPBSで、二次抗体はローダミン標識抗マウスIgG(免疫動物ヤギ)を使用した。横棒は $10\mu\text{m}$ を表す。

## 4. 考察

本研究では、リポソームをモデル膜としてゴルジ体の膜融合活性を測定し、そこに必要な因子を探ることを目的とした。そのために、ゴルジ膜とリポソームの膜融合をインビトロで脂質混合法と内水相混合法とで測定し、融合はゴルジ膜上のタンパク質、温度、イオン依存性であることを明らかにした。

#### 4-1. 本実験で使用したゴルジ体膜の性質

本研究で使用したゴルジ体膜は、Rothmanグループが、ゴルジ層板間の膜小胞輸送をインビトロで再構成したときと同じ方法で調製した[Balch, 1984; Malhotra, 1989]。ただし、Rothmanらが、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞からゴルジ膜を単離したのに対し、本実験では、ウサギの肝臓からゴルジ体膜を単離した点異なる。ウサギの肝臓を使用した理由は、培養細胞よりも大量のゴルジ体膜を調製できるからである。ウサギの肝臓から調製したゴルジ体膜とCHO細胞から調製したゴルジ体膜がインビトロで同じ活性をもつと断定できない。しかし、ウサギの肝臓から調製したゴルジ体膜からも偏平囊間の輸送を担う膜小胞が形成されること[Malhotra, 1989]や、その膜小胞の被覆を構成するタンパク質の組成もCHO細胞のものと類似していることが報告されているので[Serafini, 1991]、両者に本質的な差異はない、つまり、小胞輸送活性においてCHO細胞から調製したゴルジ膜と変わりはないと考えられる。

使用したゴルジ体膜の純度はゴルジ体マーカー酵素の濃縮度と電子顕微鏡観察により確認した。ただし、他の膜の混入の程度を定量的に示すことはできなかった。

リポソームと融合した膜をゴルジ体特異的モノクローナル抗体を使って回収できたこと、そして、ゴルジ体以外の膜分画(F1, F3, 形質膜、粗面小胞体、滑面小胞体)とリポソームとの膜融合は、ゴルジ体膜とリポソームの融合と容易に区別できたことから、リポソームと融合したのはゴルジ体由来の膜であると結論した。

注意しなくてはならないのは、これらの結果は、他のオルガネラ膜にインビトロでリポソームと融合する能力がないことを示したわけではない。ただ、ゴルジ膜とリポソームとが融合する条件では融合を測定できない、できたとしてもゴルジ膜の融合とは区別できることがわかったにすぎない。つまり、観察された融合は他の膜分画の混入によるものではないことを示すだけである。もちろん、混入したの膜も

の膜分画の混入によるものではないことを示すだけである。もちろん、混入したの膜も多少はゴルジ体膜の融合活性に寄与したであろうが、本研究で用いた膜融合測定方法がさまざまな膜同士の個別の融合の平均値の測定に基づくことを考えれば、測定に重大な影響を及ぼしたとは考えづらい。

#### 4-2. ゴルジ体膜とリポソームの膜融合を制御する因子

膜融合過程は、膜同士の会合と脂質の混合、内水相の混合の3つのステップに分けられる。会合測定は、脂質混合と内水相混合の二つの測定と違い、リアルタイム測定ができなかった。会合したが融合していない状態を直接測定したわけではなく、融合したか否かにかかわらず、会合したリポソームの量全体を測定したのである。会合測定に使用したリポソームはSUVだけであるが、SUVを使っても融合しない条件(他の膜分画や低温条件)も存在し、SUVが非特異的に融合したのではないと考えられるので、SUVとLUVを区別せずリポソームとして、議論を進める。

会合の時間依存性を調べると、脂質混合よりもかなり早く進行することがわかった。この場合、会合測定と脂質混合測定とは全く同じ試料を用いているので、この速度の食い違いの説明としては、会合してから脂質が混合するまでの間に律速段階があると考えるのが自然である。しかし、リポソーム上の脂質がゴルジ体膜上で希釈されるまでに時間がかかるとか、内水相の混合は起きたが、脂質の混合が起きなかったという解釈もできる。本研究で使った脂質混合法が、リポソーム内の蛍光脂質の距離の6乗に反比例する、共鳴エネルギー移動の原理に基づくことや、リポソームの場合、狭い領域で融合が起これば脂質の運動のために融合領域が拡散しやすい(拡散を押さえるような支えとなるものがない)ことを考えると、これらの解釈は妥当性を欠く。したがって、通常の測定条件で「会合するが、融合しない状態」が存在し、これが融合反応全体の律速段階になっていると言える。

アッセイ溶液をHepes緩衝液(145mMの塩化ナトリウムを含む)から、等張のショ糖-Hepes緩衝液に変更すると、会合は阻害されなかったが、脂質混合と内水相混合は阻害された。つまり、この条件下では上で述べた「会合するが融合しない状態」のまま留まると考えられる。この効果が、特定のイオンや膜の内外のイオン勾配によ

るものではなかったことから、単にイオン強度によると考えられる。通常の測定条件でインキュベーションした後に、高濃度の塩化カリウムを加え、イオン強度を上昇させると融合は対照とほぼ同じ速度で再開した。リポソームとゴルジ体膜は、すでに会合していたはずだから、ここで測定された速度が脂質混合速度に対応するはずである。つまり、速い会合の後に、脂質の混合が起こるわけであり、低イオン強度下では、この二つの過程の間に留まると推測できる。

膜融合のイオン要求性は、インビトロで再構成した、受容体媒介エンドサイトーシスにより生成したエンドソーム同士の融合でも報告されている[Diaz et al., 1988]。彼らもまた、通常50mM含まれる塩化カリウムをアッセイ溶液から除くと融合が全く観察されず、これにはイオンの種類やエンドソーム内外のイオン勾配は無関係だと報告している。これ以外にも、ゴルジ体間小胞輸送[Balch & Rothman, 1985]、液相エンドサイトーシスにより生成したエンドソーム融合[Braell, 1987]を再構成した例で同様のイオン要求性が観察されている。しかし、これらの例で、本研究で見られたような「会合するが融合しない状態」に留まっていたかどうかは、解析されていないので、細胞内の小胞輸送に現象であると断定できない。融合には直接関係しないが、筋小胞体のカルシウムチャンネルに対する中性分子(グルコース、グリシンなど)の透過性は低イオン強度で阻害されることが報告された[Kasai et al., 1992]。この場合、低イオン強度ではチャンネルを形成する分子のコンホメーション変化により、孔が小さくなると解釈されている。チャンネル形成タンパク質のコンホメーション変化がイオン強度によるという説は、エキソサイトーシスで考えられているような融合孔(1-2.C 参照)と考え合わせると興味深い。

低温でインキュベーションした際にも会合は阻害されないが、脂質混合は阻害された。この状態が、低イオン強度で観察されたものと同じ状態かどうかは不明である。イオン強度のように、測定中に、温度を急激に上昇させて、その後の融合速度を測定することができなかったからである。

#### タンパク質の関与について

ゴルジ体膜の表在タンパク質を高塩処理やアルカリ処理で取り除いても、融合活性に大きな影響を及ぼさなかった。ただし、このような処理をした後に、ゴルジ体膜を遠心して洗浄した際に、密度の大きく異なる膜分画が生じた。しかし、実際に

回収した膜は、処理前の膜とほぼ同じ密度のものに限定した。これは、密度に大きな変化を来した膜の構造に信頼性がないため(膜から内容物が漏れた可能性がある)である。したがって、高塩処理やアルカリ処理の効果をやや過少評価したかも知れない。

タンパク質分解酵素処理はリポソームの会合と脂質混合を同じ程度に阻害した。このことは、膜融合に、タンパク質が関与していることを示唆する。タンパク質分解酵素の基質特異性に特徴的傾向は見られなかった。活性が半分しかなくなるらないことについて、一つは、インキュベーション条件が比較的温和であることが挙げられる。また、どんな条件でも、ある程度、融合が観察されたことから、測定した融合効率の5-10%は、非特異的な脂質の交換、脱落によると考えられる。また、膜タンパク質が融合に関与している場合、タンパク質分解酵素は十分に働くことができず、活性が残った可能性もある。炭酸ナトリウム処理の後に、トリプシン処理を行うと、トリプシン処理だけよりも活性が低下したことは、この考えを支持する。ゴルジ体は本来ヘテロな膜構造体なので、タンパク質分解酵素に対する感受性が異なる可能性もある。また、ゴルジ体膜調製の際に内在性の調節分子を失い、無差別な融合が起こりやすくなったと考えることもできるが、低温と低イオン強度では、融合が阻害されたので、この考えは成り立たない。

タンパク質分解酵素の影響が、会合と融合に対して同様の効果を示したので、タンパク質は、会合にのみ関与する可能性がある。つまり、ゴルジ体上に存在するリポソームの結合場所が、タンパク質分解酵素処理により、半減するために、全体の融合活性が半減したと考えられる。たとえば、会合を制御するタンパク質と、融合を制御するタンパク質とが異なる場合、タンパク質分解酵素により両タンパク質共に活性が半減するならば、結合活性は $1/2$ に、融合活性は少なくとも $1/2$ 以下になるはずである。しかし、これは実験結果と一致しないので、いまのところ、融合と結合は同一のタンパク質に媒介されているか、たとえ、両者が異なるタンパク質であるとしても、融合を制御するタンパク質はタンパク質分解酵素処理に耐性であるといえる。ウイルスの膜融合活性タンパク質は、標的膜との結合活性と融合活性をあわせもつので、ゴルジ体膜上に存在するタンパク質がリポソームとの結合能と融合能を同時に持っていたとしても不思議ではない。

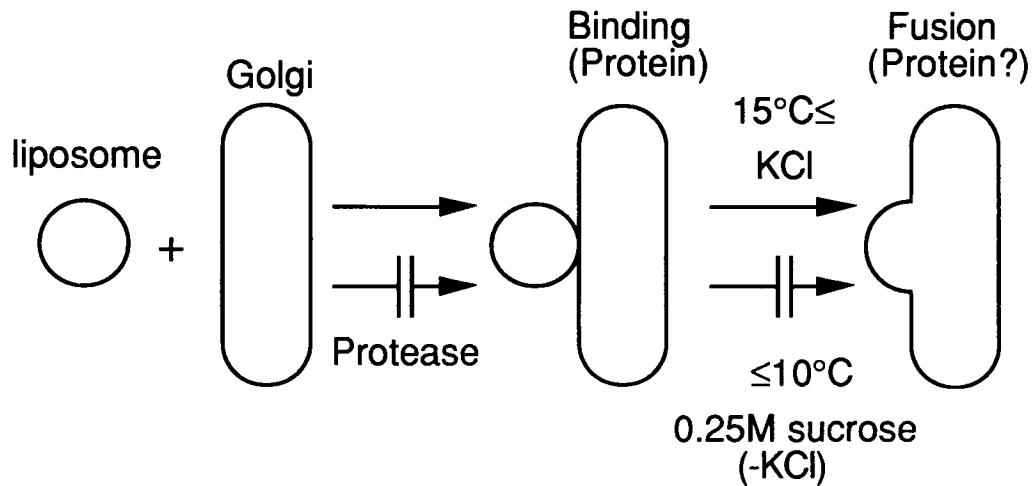


図4-1 ゴルジ体膜とリポソームとの膜融合の結果のまとめ

ゴルジ体膜とリポソームとの会合はゴルジ体膜のタンパク質分解酵素処理(Proteas)により阻害される。会合(Binding)から融合(Fusion)に至る段階が全体の反応の律速となる。低イオン強度(-KCl)や低温でのインキュベーションでは、融合は阻害されるが会合は阻害されない。

### 脂質の影響について

リポソームの脂質の組成の影響を調べるために、数種類のリポソームを作り、その活性を調べた。PS、PEを50%含んだリポソームは、DOPC100%と比べて、結合、融合活性ともに約2倍に増加した。PSは、全体として負の電荷を帯びているが、活性の増大に電荷が寄与したわけでないのは、PEの結果を見れば明白である。ただし、PSやカルジオリピンなどの酸性脂質は、融合を起こしやすいといわれ、他の脂質膜では融合を誘起できなかったタンパク質が、PSリポソームの融合を引き起こした例は多い[Stegmann et al., 1989]。また、PEは、水との親和性が乏しいのでリポソームが作りにくく、形成後も不安定である点も考慮しなくてはならない。しかし、インビボで生体膜のPE、PS含量が融合活性を調節する例も報告されている。筋芽細胞の形質膜の脂質二重層の外側の層には、赤血球と比べてPEとPSに富み[Sessions & Horwitz, 1981, 1983]、さらに、多核体形成のための細胞融合を起こす直前には、このPE/PS含量が増加するのである[Santini et al., 1990]。ゴルジ体膜をはじめとする細胞内の膜は脂質二重層の細胞質側の層にPE、PSなどの脂質が豊富である。これは、脂質が小胞体で合成された後に、フリッパーゼとよばれるタンパク質がPCを内腔側の脂質二重層に移送するためである。このため、本来、ゴルジ体の膜は膜融合を起こしやすい性質があるのかも知れない。

卵黄PCやコレステロールを加えると結合と融合活性に差が見られた。コレステロールには、脂質二重層の流動性を抑制するなど膜を安定化させる作用がある[Haywood, 1974]ので、これらの脂質が、前述した「会合するが融合しない状態」から、脂質混合へと至る速度を低下させたと考えられる。

### ATPの必要性について

序論でも述べたとおり、従来の細胞内の小胞輸送再構成アッセイ方法の多くは、融合にはATPと細胞質タンパク質が必要であるとしている。しかし、これらのアッセイ方法は、粗精製の膜分画同士を混ぜ合わせたものである。このため、融合測定と言っても実際には、小胞の生成、輸送、結合、融合の四つの過程(エンドソーム融合の場合は、すでに生成しているので三つ)が存在する。そして、粗精製分画の中には、これらの過程を促進する因子も含まれれば、阻害する因子も含まれ、それぞれに関与する因子の数は、総計ではかなりの数に及ぶはずである。融合過程に必要な



タンパク質も可溶性のもの以外は同定するのは難しい。うまく同定できたとしてもそれがどの段階に関与しているのかは確かめられない。恐らく、これが原因で、細胞内小胞輸送に関与する因子の同定が遅れているのだろう。

Rothmanらは、上で述べた欠点を克服するため、彼らの作ったゴルジ体間小胞輸送を阻害する試薬を調べ、阻害されるステップを時間的に区別した。つまり、阻害試薬ひとつについてひとつの律速段階が存在するとして、反応の中間体を分類した。この方法を用いることで、ゴルジ体の輸送小胞がゴルジ体に結合し、脱被覆してから融合するまでの間にATPが関与すると結論した(図1-4参照)[Orci et al., 1989]。この事実から、直接の証拠がないにもかかわらず、他の細胞内輸送再構成実験でもATPが膜融合に関与するとする考えが強かった。と言うよりも、ATP依存的な活性を示すことが膜小胞再構成系が生理的機能を反映することの証拠のようにされてきた。

しかし、最近になって、Rothmanらの中間体モデルが根本的に問題があることがわかった。彼らのモデルでの、膜融合に先立つ段階に関与するタンパク質が、ATP依存的に、小胞輸送活性測定の基質であるUDP-N-アセチルグルコサミンのゴルジ体内腔への取り込みを促進することがわかった[Hiebsch et al., 1992]。つまり、ATPは、膜融合ではなく、膜融合の検出に必要なのである。このような誤解は、酵素活性に基づいて小胞輸送を測定してるアッセイ方法のすべてについて起こりえる。したがって、ATP以外の因子で、細胞内小胞輸送に関与するといわれたものについても、再考する必要がでてきた。そのうえ、これまで、膜融合に関与し、なおかつATPと結合すると考えられていたNSFタンパク質と、その酵母での類縁タンパク質Sec17pも、膜融合よりも以前のステップに関与する証拠がでてきた[Rexach & Schekman, 1991; Wattenberg et al., 1992]。ウイルスの誘起する膜融合やリポソームと生体膜の膜融合では以前からATPの関与はいわれていなかったことを考え合わせれば、細胞内の膜融合がATPに依存しなくても不思議ではない。より単純な系で得られた今回の知見は、細胞内の膜融合に関する概念を再構築するのに、有益な情報になると考える。

#### 4-3. セミインタクト細胞でのゴルジ体とリポソーム融合との比較

本研究の欠点のひとつに、単離したゴルジ体膜を使用したために、ゴルジ体が細胞内で維持している極性を失ってしまっている可能性がある。そのために、リポソ

ームとの融合がインビトロだけで観察される特殊な現象である恐れがある。しかし、すでに、ニトロセルロース膜で形質膜を物理的に透過性にした細胞(セミインタクト細胞)を使って、細胞外から加えた蛍光性リポソーム(DOPC/NBD-PE/Rh-PE)がゴルジ体と融合することが報告されている[Kobayashi & Pagano, 1988]。融合測定は、共鳴エネルギー移動の解消を使った方法であるが、蛍光顕微鏡での観察に基づいているので、定量性にかける。彼らの結果と本研究の結果を比較すると、融合に細胞質因子が必要でないことや、2℃でもリポソームはゴルジ体膜に結合するが、融合は、15℃以上でなければ起こらないこと、結合にはATPが必要でない点では、同じ結果が得られた。ただし、融合にATPが必要で、直径100nm以上のリポソームは融合しないことや、PSを50%含むリポソームが融合に関与しないことなどが、異なる結果である。

この結果の食い違いの説明として、一つにはインビトロとセミインタクト細胞の違いが挙げられる。セミインタクト細胞は微小管やアクチンフィラメントなどの細胞骨格が残っているし、他のオルガネラ膜も存在する。リポソームは、これらの細胞構成要素と相互作用する可能性もあり、たとえば、ATPはその相互作用に必要な因子なのかもしれないし、負の電荷を帯びたPSリポソームが、セミインタクト細胞内の、正電荷を帯びた細胞内要素に捕捉された可能性もある。

リポソームの作り方にも違いがある。Kobayashiらがエタノールインジェクション法でリポソームを作成したのに対し、本研究では逆相蒸発法とポリカーボネート膜押し出し法で作成している。また、動的光散乱法によるリポソームのサイズ測定では、エタノールインジェクション法で作ったリポソームは、ポリカーボネート膜で大きさをそろえたとしても、リポソームの直径にかなりの幅があるので[下岡と寺田, 1992]、100 nm以上のリポソームが融合しないと断定するのには問題がある。

#### 4-4 ゴルジ体膜とリポソームとの融合と生体機能との関連

本研究では、リポソームとゴルジ体膜の融合にタンパク質が関与することが示されたわけだが、このようなタンパク質が生体内で担う機能について考察する。

細胞内小胞輸送との関連。リポソームは脂質二重膜中や内水相にタンパク質を含まない。一方、細胞内に存在する輸送小胞は、運搬すべきタンパク質を内部に含む

うえに、脂質二重膜中およびその外側にも多くのタンパク質が含まれている。リボソームにこれらのタンパク質が存在しないということは、生体内で、これらのタンパク質が担っている機能を再構成できないということである。そこで、輸送小胞のタンパク質の機能を考えてみる。小胞内のタンパク質は輸送すべきタンパク質の選別と小胞への包み込みを行い、さらに小胞を形成する助けとなる被覆タンパク質を小胞上に集めるためのシグナルになると考えられる。このモデルは、エンドサイトーシス経路のクラトリン被覆小胞や、ゴルジ体の非クラトリン被覆小胞の研究から考えられるようになった[Pearse & Robinson, 1990; Keen, 1990]。小胞の表在タンパク質は、小胞形成後に相手の膜を認識する役や、相手の膜に認識されるシグナル役として利用される。これらの役割を担うタンパク質の候補として、低分子量GTP結合タンパク質が発見され、実際に細胞内の多くの小胞輸送過程に関与している[Balch, 1990; Pryer et al., 1992]。本研究では、膜融合に重点を置いているので、これらの機能を司るタンパク質がリボソームに含まれなくても問題はない。実際、ゴルジ体と融合する際には、非クラトリン被覆小胞は脱被覆していることが確認されているので[Orci et al., 1989]、被覆タンパク質や低分子量GTP結合タンパク質が膜融合に関与していることはないであろう。むしろ被覆を形成するタンパク質は、無差別の融合を防ぐ役割をしていると考えられている[Altstiel, 1983; Pelham, 1991]。

問題があるとすれば、生体内で、ゴルジ体膜との膜融合を担うタンパク質が膜小胞に存在する場合である。もし、そうであるならば、本研究で存在が予想されるタンパク質が、ゴルジ体の膜融合を担う可能性はなくなる。しかし、ゴルジ体の膜融合を担うタンパク質は、ゴルジ体に存在する可能性が大きいと思われる。ひとつには、たとえ、膜融合タンパク質が輸送小胞に局在するとしても、その供給場所は、ゴルジ体のはずであるし、融合した後にゴルジ体膜に移行するはずである。また、ゴルジ体は、細胞分裂の際に断片化し、分裂後、再び凝集し元の形に戻る。このときに膜融合が起きることはほぼ確実であり、それを司るタンパク質は、ゴルジ体に存在すると仮定するのが合理的だからである。

細胞内脂質輸送に関連。脂質輸送とタンパク質輸送はしばしば混同されるが、小胞体で生合成された脂質を各オルガネラに輸送する経路を指す[van Meer, 1990]。脂質は、ミトコンドリアやペルオキシソームには、脂質交換タンパク質により単分子

で輸送されるが、ゴルジ体へは、小胞を介して運ばれるとする説が有力である。これらについては、タンパク質輸送ほど、調べられていないが、再構成した例では、ATPや温度に依存した輸送が行われており[Moreau et al., 1991]、タンパク質の関与が示唆されている。脂質を運搬する小胞が、タンパク質小胞輸送に関与する小胞とは、全く独立に存在するのかどうかについてはまだ明らかではない。しかし、コレステロールは、タンパク質輸送小胞とは別の、脂質を多く含んだ小胞によって運搬されるという知見[Urbani & Simoni, 1990]や、細胞外から形質膜に蛍光性脂質を加えると、小胞輸送される現象が観察されている[Sleight & Pagano, 1984, 1985]ことを考えれば、脂質に富んだ小胞を輸送する機構が細胞内に存在する可能性は大きい。リポソームはどちらかと言えば、このような脂質輸送に関与する小胞の性質に近いところがあるので、リポソームとゴルジ体膜との融合に関与するタンパク質も脂質輸送に関与しているのかも知れない。

細胞内脂質合成・代謝に関連。小胞体でのタンパク質の糖鎖修飾が、脂質量の増加によって促進されること[Martinez-Bazenat, 1988]や、前述した筋芽細胞の融合におけるように、脂質組成がオルガネラの機能に影響を及ぼす例がある。ゴルジ体の脂質組成と機能の相関については、適切なアッセイ方法がなかったために、これまでほとんど調べられていなかった。ところが、酵母のタンパク質分泌阻害変異株が、ゴルジ体に存在するリン脂質交換タンパク質の欠損によることが明らかになったことから、脂質組成がゴルジ体のタンパク質輸送活性と密接な関係をもつことが示唆された[Bankaitis, 1990; Cleves et al., 1991]。また、ゴルジ体でPCの合成が行われているとする報告もある[Higgins & Fieldsend, 1987]。こうしたことから、ゴルジ体の機能維持を担うタンパク質が、脂質に対して大きな親和性を持っているために、リポソームと容易に結合し、融合を引き起こすとも考えることもできる。脂質合成の中心である滑面小胞体もSUVとの融合活性をもっていたことも、脂質との親和性の大きさによるのかも知れない。

リポソームとゴルジ体膜の融合に関与するタンパク質が上で述べた機能のどれかと関連する可能性は大きい。融合に関与するのか、会合だけに関与するのか、現時点でははっきりしないが、この過程に関与するタンパク質を探ることは興味深い。

そのための方法として、ゴルジ体膜タンパク質を再構成したリポソームを作り、どの条件で(どのタンパク質を含んだ再構成膜が)もっとも融合活性を発揮するかを調べるという方法と、リポソームとゴルジ体膜との結合を阻害するモノクローナル抗体を作製するという2つの方法がある。モノクローナル抗体作製に関しては、すでに試みたが、現在のところ成功していない。

## 5. 謝辞

本研究全般にわたって、指導していただいた大西 俊一教授・村田 昌之博士に深く感謝いたします。

大阪大学産業科学研究所の多賀谷 光男博士には、ゴルジ体の調製法を初めとする実験技術を教えていただいたり、研究を進めるうえでの助言をして頂きました。北里大学医学部の山科 正平教授には電子顕微鏡写真を撮影していただき、玉木 英明博士にはガラクトシルトランスフェラーゼの活性を測定していただきました。大分医科大学の瀬口 正志博士には、C6A3に関して共同研究していただきました。これらの方々に感謝いたします。

適宜、助言をしていただいた伊藤 忠直助教授、研究の一部を手伝っていただいた菱田 竜一、白井 良憲、庄野 修の各氏をはじめとする、いろいろお世話になった大西研究室の大学院生と宮崎 こずえさんに感謝いたします。

## 6. 参考文献



- Al-Kaissi, E., and Mostratos, A. (1983). Assessment of substrates for horseradish peroxidase in enzyme immunoassay. *J. Immun. Method* 58, 127-132.
- Almers, W. (1990). Exocytosis. *Annu. Rev. Physiol.* 52, 607-624.
- Altstiel, A., and Branton, D. (1983). Fusion of coated vesicles with lysosomes: measurement with a fluorescence assay. *Cell* 32, 921-929.
- Balch, W. E., Dunphy, W. G., Braell, W. A., and Rothman, J. E. (1984). Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine. *Cell* 39, 405-416.
- Balch, W. E., and Rothman, J. E. (1985). Characterization of protein transport between successive compartments of the Golgi apparatus: asymmetric properties of donor and acceptor activities in a cell-free system. *Arch. Biochem. Biophys.* 240, 413-425.
- Balch, W. E. (1990). Small GTP-binding proteins in vesicular transport. *Trends Biochem. Sci.*, 15, 473-477.
- Bangham, A. D., Standish, M. M., and Watkins, J. C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol* 13, 238-252.
- Bankaitis, V. A., Malehorn, D. E., Emr, S. D., and Greene, R. (1989). The *Saccharomyces cerevisiae* SEC14 gene encodes a cytosolic factor that is required for transport of secretory proteins from the yeast Golgi complex. *J. Cell Biol.* 108, 1271-1281.
- Bartlett, G. R. (1959). Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* 234, 466-468.
- Beckers, C. J. M., Keller, D. S., and Balch, W. E. (1987). Semi-intact cells permeable to macromolecules: use in reconstitution of protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *Cell* 50, 523-534.
- Beckers, C. J. M., and Balch, W. E. (1989). Calcium and GTP: essential components in vesicular trafficking between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* 108, 1245-1256.
- Beckers, C. J. M., Block, M. R., Glick, B. S., Rothman, J. E., and Balch, W. E. (1989). Vesicular transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi stack requires the NEM-sensitive fusion protein. *Nature* 339, 397-398.
- Beckers, C. J. M., Plutner, H., Davidson, H. W., and Balch, W. E. (1990). Sequential intermediates in the transport of protein between the endoplasmic reticulum and the Golgi. *J. Biol. Chem.* 265, 18298-18310.
- Bental, M., Lelkes, P. I., Scholma, J., Hoekstra, D., and Wilschut, J. (1984).

- Ca<sup>2+</sup>-independent, portein-mediated fusion of chromaffin granule ghosts with liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 774, 296-300.
- Bentz, J., and Ellens, H. (1988). Membrane fusion: kinetics and mechanisms. *Colloids Surfaces* 30 65-112.
- Bentz, J., Ellens, H., and Alford, D. (1990). An architecture for the fusion site of influenza hemagglutinin. *FEBS lett.* 276, 1-5.
- Blobel, C. P., Wolfsberg, T. G., Turck, C. W., Myles, D. G., Primakoff, P., and White, J. M. (1992). A Potential Fusion Peptide and an Integrin Ligand Domain in a Protein Active in Sperm-Egg Fusion. *Nature* 356, 248-252.
- Block, M. R., Glick, B. S., Wilcox, C. A., Wieland, F. T., and Rothman, J. E. (1988). Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7852-7856.
- Bomsel, M., Parton, R., Kuznetsov, S. A., Schroer, T. A., and Gruenberg, J. (1990). Microtubule- and motor-dependent fusion in vitro between apical and basolateral endocytic vesicles from MDCK cells. *Cell* 62, 719-731.
- Braell, W. A. (1987). Fusion between endocytic vesicles in a cell-free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1137-1141.
- Breckenridge, L. J., and Almers, W. (1987) Final steps in exocytosis observed in a cell with giant secretory granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1945-1949.
- Brew, K., Shaper, J., Olsen, K., Trayer, I., and Hill, R. Cross-linking of the components of lactose synthetase with dimethylpylimelidate (1975). *J. Biol. Chem.* 250, 1434-1444.
- Clary, D. O., and Rothman, J. E. (1990). Purification of three related peripheral membrane proteins needed for vesicular transport. *J. Biol. Chem.* 265, 10109-10117.
- Clary, D. O., Griff, I. C., and Rothman, J. E. (1990). SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell* 61, 709-721.
- Cleves, A. E., McGee, T. P., Whitters, E. A., Champion, K. M., Aitken, J. R., Dowhan, W., Goebel, M., and Bankaitis, V. A. (1991). Mutations in the CDP-choline pathway for phospholipid biosynthesis bypass the requirement for an essential phospholipid transfer protein. *Cell* 64, 789-800.
- Colombo, M. I., Mayorga, L. S., Casey, P. J., and Stahl, P. D. (1992). Evidence of a role for heterotrimeric GTP-binding proteins in endosome fusion. *Science* 255, 1695-1697.

- Copeland, C. S., Doms, R. W., Bolzau, E. M., Webster, R. G., and Helenius, A. (1986). Assembly of influenza hemagglutinin trimers and its role in intracellular transport. *J. Cell Biol.* 103, 1179-1191.
- Copeland, C. S., Zimmer, K. P., Wagner, K. R., Healey, G. A., Mellman, I., and Helenius, A. (1988). Folding, trimerization, and transport are sequential events in the biogenesis of influenza virus hemagglutinin. *Cell* 53, 197-209.
- Curran, M. J., Brodwick, M. S., and Edwards, C. (1984). Direct visualization of exocytosis in mast cells. *Biophys. J.* 45, 170a.
- d'Enfert, C., Wuestehube, L. J., Lila, T., and Schekman, R. (1991). Sec12p-dependent membrane binding of the small GTP-binding protein Sar1p promotes formation of transport vesicles from the ER. *J. Cell Biol.* 114, 663-670.
- Dewald, B., and Touster, O. (1973). A new  $\alpha$ -D-mannosidase occurring in Golgi membranes. *J. Biol. Chem.* 248, 7223-7233.
- Diaz, R., Mayorga, L., and Stahl, P. D. (1988). In vitro fusion of endosomes following receptor-mediated endocytosis. *J. Biol. Chem.* 263, 6093-6100.
- Diaz, R., Mayorga, L. S., Weidman, P. J., Rothman, J. E., and Stahl, P. D. (1989). Vesicle fusion following receptor-mediated endocytosis requires a protein active in Golgi transport. *Nature* 339, 398-400.
- Ellens, H., Bentz, J., and Szoka, F. C. (1985).  $H^+$  and  $Ca^{2+}$  induced fusion and destabilization of liposomes. *Biochemistry* 24, 3099-3106.
- Fleischer, S., and Kervina, M. (1974). Subcellular fractionation of rat liver. *Methods Enzymol.* 31, 6-41.
- Fujiki, Y., Hubbard, A. L., Fowler, S., and Lazarow, P. B. (1982). Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 93, 97-102.
- Gething, M. J., Doms, R. W., York, D., and White, J. (1986). Studies on the mechanism of membrane fusion: site-specific mutagenesis of the hemagglutinin of influenza virus. *J. Cell Biol.* 102, 11-23.
- Goda, Y., and Pfeffer, S. R. (1991). Identification of a novel, N-ethylmaleimide-sensitive cytosolic factor required for vesicular transport from endosomes to the trans-Golgi network in vitro. *J. Cell Biol.* 112, 823-831.
- Godley, L., Pfeifer, J., Steinhauer, D., Ely, B., Shaw, G., Kaufmann, R., Suchanek, E., Pabo, C., Skehel, J. J., Wiley, D. C., and Wharton, S. (1992). Introduction of

- intersubunit disulfide bonds in the membrane-distal region of the influenza hemagglutinin abolishes membrane fusion activity. *Cell* 68, 635-645.
- Gorvel, J.-P., Chavrier, P., Zerial, M., and Gruenberg, J. (1991). rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* 64, 915-925.
- Griffiths, G., and Simons, K. (1986). The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* 234, 438-443.
- Gruenberg, J., and Howell, K. E. (1989). Membrane traffic in endocytosis: insights from cell-free analysis. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5, 453-481.
- Haywood, A. M. (1974). Fusion of sendai virus with model membranes. *J. Mol. Biol.* 87, 625
- Hicke, L., and Schekman, R. (1992). Sec23p and a novel 105-kDa protein function as a multimeric complex to promote vesicle budding and protein transport from the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 8, 1677-1684.
- Hiebsch, R. R., and Wattenberg, B. W. (1992). Vesicle fusion in protein transport through the Golgi in vitro does not involve long-lived prefusion intermediates - a reassessment of the kinetics of transport as measured by glycosylation. *Biochemistry* 31, 6111-6118.
- Higgins, J. A., and Fieldsend, J. K. (1987). Phosphatidylcholine synthesis for incorporation into membranes of for secretion as plasma lipoproteins by Golgi membranes of rat liver. *J. Lipid Res.* 28, 268-278
- Hino, Y., Asano, A., Sato, R., and Shimizu, S. (1978). Biochemical studies of rat liver Golgi apparatus. *J. Biochemistry* 83, 909-923.
- Horth, M., Lambrecht, B., Khim, M. C. L., Bex, F., Thiriart, C., Ruyschaert, J.-M., Burny, A., and Brasseur, R. (1991). Theoretical and functional analysis of the SIV fusion peptide. *EMBO J.* 10, 2747-2755.
- Hsu, V. W. , Yuan, L. C., Nuchtern, J. G., Lippincott-Schwartz, J., Hammerling, G. J., and Klausner, R. D. (1991). A recycling pathway between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus for retention of unassembled MHC class I molecules. *Nature* 352, 441-444.
- Huttner, W. B., and Tooze, S. A. (1989). Biosynthetic protein transport in the secretory pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1, 648-654.
- Kantor, H. L., and Prestegard, J. H. (1975). Fusion of fatty acid containing lecithin vesicles. *Biochemistry* 14, 1790-1794.
- Kasai, M., Kawasaki, T., and Yamamoto, K. (1992). Permiation of neutral molecules

- through calcium channel in sarcoplasmic reticulum vesicles. *J. Biochem.* 112, 197-203.
- Kearny, J. F., Radbruch, A., Liesegang, B., and Rajewsky, K. (1979). A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J. Immunol.* 123, 1548-1550.
- Keen, J. H. (1990). Clathrin and associated assembly and disassembly proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 415-438.
- Klenk, H. D., Rott, R., Orlich, M., and Blodorn, J. (1975). Activation of influenza A virus by trypsin treatment. *Virology* 134, 334-336.
- Kobayashi, T., and Pagano, R. E. (1988). ATP-dependent fusion of liposome with the Golgi apparatus of perforated cells. *Cell* 55, 797-805.
- Kusumi, A., Tsuji, A., Murata, M., Sako, Y., Yoshizawa, A., Kagiwada, S., Hayakawa, T., and Ohnishi, S. (1991). Development of a streak-camera-based time-resolved microscope fluorimeter and its application to studies of membrane fusion in single cells. *Biochemistry* 30, 6517-6527.
- Lawaczeck, R., Gervais, M., Nandi, P. K., and Nicolau, C. (1987). Fusion of negatively charged liposomes with clathrin-uncoated vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 903, 112-122.
- Lenhard, J. M., Kahn, R. A., and Stahl, P. D. (1992). Evidence for ADP-ribosylation factor (ARF) as a regulator of in vitro endosome-endosome fusion. *J. Biol. Chem.* 267, 13047-13052.
- Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L., Tipper, C., Amherdt, M., Orci, L., and Klausner, R. D. (1991). Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell* 67, 601-616.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Maeda, T., and Ohnishi, S. (1974). Membrane fusion: transfer of phospholipid molecules between phospholipid bilayer membranes. *Biophys. Biochem. Res. Commun.* 60, 1509-1516.
- Maeda, T., Kawasaki, K., and Ohnishi, S. (1981). Interaction of influenza virus hemagglutinin with target membrane lipid is a key step in virus-induced hemolysis and fusion at pH 5.2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 4133-4137.
- Malhotra, V., Serafini, T., Orci, L., Shepherd, J. C., and Rothman, J. E. (1989).

- Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the Golgi stack. *Cell* 58, 329-336.
- Martinez-Bazenet, C., Audigier-Petit, C., Frot-Coutaz, J., Got, R., Nicolau, C., and Letoublon, R. (1988). Protein-mediated fusion of liposomes with microsomal membranes of *Aspergillus niger* : evidence for a complex mechanism dealing with membranous and cytosolic fusogenic proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 943, 35-42.
- McCaffrey, G., Clay, F. J., Kelsay, K., and Sprague, G. F. (1987). Identification and regulation of a gene required for cell fusion during mating of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2680-2690.
- Mellman, I., and Simons, K. (1992). The Golgi complex: in vitro veritas? *Cell* 68, 829-840.
- Miller, S. G., and Moore, H.-P. H. (1991). Reconstitution of constitutive secretion using semi-intact cells: regulation by GTP but not calcium. *J. Cell Biol.* 112, 39-54.
- Moreau, P., Rodriguez, M., Cassagne, C., Morre, D. M., and Morre, D. J. (1991). Trafficking of lipids from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus in a cell-free system from rat liver. *J. Biol. Chem.* 266, 4322-4328.
- Murata, M., Sugahara, S., Takahashi, S., and Ohnishi, S. (1987). pH-dependent membrane fusion activity of a synthetic twenty amino acids peptide with the same sequence as that of the hydrophobic segment of influenza virus hemagglutinin. *J. Biochem.* 102, 957-962.
- Murata, M., Kagiwada, S., Takahashi, S., and Ohnishi, S. (1991a). Membrane fusion induced by mutual interaction of the two charge-reversed amphiphilic peptides at neutral pH. *J. Biol. Chem.* 266, 14353-14358.
- Murata, M., Kagiwada, S., Hishida, R., Ishiguro, R., Ohnishi, S., and Takahashi, S. (1991b). Modification of the N-terminus of membrane fusion-active peptides blocks the fusion activity. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 179, 1050-1055.
- Murata, M., Takahashi, S., Kagiwada, S., Suzuki, A., and Ohnishi, S. (1992a). pH-Dependent membrane fusion and vesiculation of phospholipid large unilamellar vesicles induced by amphiphilic anionic and cationic peptides. *Biochemistry* 31, 1986-1992.
- Murata, M., Itoh, J. H., Kagiwada, S., Hishida, R., Hotani, H., and Ohnishi, S. (1992b). The interaction between microtubules and the Golgi vesicles isolated from rabbit liver in vitro. *Biol. Cell* 75,
- Neher, E., and Marty, A. (1982). Discrete changes of cell membrane capacitance observed

- under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6712-6716.
- Nir, S., Bentz, J., and Wilschut, J. (1980) Mass action kinetics of phosphatidylserine vesicle fusion as monitored by coalescence of internal vesicle volumes. *Biochemistry* 19, 6030-6036.
- Nir, S., Duzugunes, N., and Bentz, J. (1983) Binding of monovalent cations to phosphatidylserine and modulation of  $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{Mg}^{2+}$ -induced vesicle fusion. *Biochim. Biophys. Acta* 735, 160-172.
- Ohashi M., and Ohnishi, S. (1991). An inhibitory effect of a protein kinase inhibitor, staurosporine, on delivery of endocytosed asialoglycoprotein to lysosome in monolayer culture of rat hepatocytes. *Exp. Cell Res.* 197, 168-175.
- Ohnishi, S. (1988). Fusion of viral envelopes with cellular membranes. *Curr. Top. Membr. Transp.* 32, 257-296.
- Oka, T., Nishikawa, S., and Nakano, A. (1991). Reconstitution of GTP-binding Sar1 protein function in ER to Golgi transport. *J. Cell Biol.* 114, 671-679.
- Orci, L., Malhotra, V., Amherdt, M., Serafini, T., and Rothman, J. E. (1989). Dissection of a single round of vesicular transport: sequential intermediates for intercisternal movement in the Golgi stack. *Cell* 56, 357-368.
- Palade, G. (1975). Intracellular aspects of the process of protein secretion. *Science* 189, 347-358.
- Papahadjopoulos, D., Poste, G., Schaeffer, B. E., and Vail, W. J. (1974). Membrane fusion and molecular segregation in phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 352, 10-28.
- Papahadjopoulos, D., Vail, W. J., Jacobson, K., and Poste, G. (1975). Cochleate lipid cylinders: formation by fusion of unilamellar lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 394, 483-494.
- Pearse, B. M. F., and Robinson, M. S. (1990). Clathrin, adaptors, and sorting. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6, 151-171.
- Pelham, H. R. B. (1989). Control of protein exit from the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5, 1-23.
- Pelham, H. R. B. (1991). Multiple targets for brefeldin A. *Cell* 67, 449-451.
- Primakoff, P., Hyatt, H., and Tredick-Kline, J. (1987). Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. *J. Cell Biol.*

104, 141-149.

- Pryer, N. K., Wuestehube, L. J., and Schekman, R. (1992). Vesicle-mediated protein sorting. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 471-516.
- Rexach, M. F., and Schekman, R. W. (1991). Distinct biochemical requirements for the budding, targeting, and fusion of ER-derived transport vesicles. *J. Cell Biol.* 114, 219-229.
- Rothman, J. E., and Orci, L. (1992). Molecular dissection of the secretory pathway. *Nature* 355, 409-415.
- Salzman, N. H. , and Maxfield, F. R. (1988). Intracellular fusion of sequentially formed endocytic compartments. *J. Cell Biol.* 106, 1083-1091.
- Salzman, N. H. , and Maxfield, F. R. (1989). Fusion accessibility of endocytic compartments along the recycling and lysosomal endocytic pathways in intact cells. *J. Cell Biol.* 109, 2097-2104.
- Santini, M. T., Indovina, P. L., Cantafora, A., and Blotta, I. (1990). The cesium-induced delay in myoblast membran fusion is accompanied by changes in isolated membrane lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1023, 298-304.
- Saraste, J., and Kuismanen, E. (1984). Pre- and post-Golgi vacuoles operate in the transport of Semliki Forest virus membrane glycoproteins to the cell surface. *Cell* 38, 535-549.
- Saraste, J., Parade, G. E., and Farquhar, M. G. (1986). Temperature sensitive steps in the transport of secretory proteins through the Golgi complex in exocrine pancreatic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 6425-6429.
- Seguchi, T., Goto, Y., Ono, M., Fujiwara, T., Shimada, T., Kung, H. F., Nishioka, M., Ikehara, Y., and Kuwano, M. (1992). Brefeldin-A-resistant mutants of human epidermoid carcinoma cell line with structural changes of the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* 367, 11626-11630.
- Serafini, T., Stenbeck, G., Brecht, A., Lottspeich, F., Orci, L., Rothman, J. E., and Wieland, F. T. (1991). A coat subunit of Golgi-derived non-clathrin-coated vesicles with homology to the clathrin-coated vesicle coat protein  $\beta$ -adaptin. *Nature* 349, 215-220.
- Sessions, A., and Horwitz, A. F. (1981). Myoblast aminophospho lipid asymmetry differs from that of fibroblasts. *FEBS Lett.* 134, 75-78.
- Sessions, A., and Horwitz, A. F. (1983). Differentiation-related differences in the plasma membrane phospholipid asymmetry of myogenic and fibrogenic cells. *Biochim.*



- Biophys. Acta 728, 103-111.
- Shen, D.-F., Huang, A., and Huang, L. (1982). An improved method for covalent attachment of antibody to liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 689, 31-37.
- Siegel, D. P., Burns, J. L., Chestnut, M. H., and Talmon, Y. (1989). Intermediates in membrane fusion and bilayer/nonbilayer phase transition imaged by time-resolved cryo-transmission electron microscopy. *Biophys. J.* 56, 161-169.
- Singleton, W. S., Gray, M. S., Brown, M. L., and White, J. L. (1965). Chromatographically homogeneous lecithin from egg phospholipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 42, 53-56.
- Sleight, R. G., and Pagano, R. E. (1984). Transport of a fluorescent phosphatidylcholine analog from the plasma membrane to the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* 99, 742-751.
- Sleight, R. G., and Pagano, R. E. (1985). Transbilayer movement of a fluorescent phosphatidylethanolamine analogue across the plasma membranes of cultured mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 260, 1146-1154.
- Stegmann, T., Hoekstra, D., Scherphof, G., and Wilschut, J. (1986). Fusion activity of influenza virus : a comparison between biological and artificial target membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 261, 10966-10969.
- Stegmann, T., Doms, R. W., and Helenius, A. (1989a). Protein-mediated membrane fusion. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 18, 187-211.
- Stegmann, T., Nir, S., and Wilschut, J. (1989b) Membrane fusion activity of influenza virus. Effects of gangliosides and negatively charged phospholipids in target liposomes. *Biochemistry* 28, 1698-1704.
- Stegmann, T., White, J. M., and Helenius, A. (1990). Intermediates in influenza induced membrane fusion. *EMBO J.* 9, 4231-4241.
- Struck, D. K., Hoekstra, D., and Pagano, R. E. (1981). Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. *Biochemistry* 20, 4093-4099.
- Stutzin, A. (1986). A fluorescence assay for monitoring and analyzing fusion of biological membrane vesicles in vitro. *FEBS Lett.* 197, 274-280.
- Swanson, M. A. (1955). Glucose-6-phosphatase from liver. *Methods in Enzymology* 2, 541-543.
- Tabas, I., and Kornfeld, S. (1979). Purification and characterization of a rat liver Golgi  $\alpha$ -D-mannosidase capable of processing asparagine-linked oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 254, 11655-11663.

- Thomas, L., Clarke, P. R., Pagano, M., and Gruenberg, J. (1992). Inhibition of membrane fusion in vitro via cyclin-B but not cyclin-A. *J Biol Chem* 267, 6183-6187.
- Thyverg, J., and Moskalewski, S. (1985). Microtubules and the organization of the Golgi complex. *Exp. Cell Res.* 159, 1-16.
- Trueheart, J., Boeke, J. D., and Fink, D. R. (1987). Two genes required for cell fusion during yeast conjugation: evidence for a pheromone-induced surface protein. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2316-2328.
- Tuomikoski, T., Felix, M.-A., Doree, M., and Gruenberg, J. (1989). Inhibition of endocytic vesicle fusion in vitro by the cell cycle control protein kinase cdc2. *Nature* 342, 942-945.
- Urbani, L., and Simoni, R. D. (1990). Cholesterol and vesicular stomatitis virus G protein take separate routes from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 265, 1919.
- van Meer, G. (1989). Lipid traffic in animal cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5, 247-275.
- Vida, T. A., Graham, T. R., and Emr, S. D. (1990) In vitro reconstitution of intercompartmental protein transport to the yeast vacuole. *J. Cell Biol.* 111, 2871-2884.
- Vogel, S. S., Chernomordik, L. V., and Zimmerberg, J. (1992). Calcium-triggered fusion of exocytotic granules requires proteins in only one membrane. *J. Biol. Chem.* 267, in press.
- Warren, G. (1987). Signals and salvage sequences. *Nature* 327, 17-18.
- Wattenberg, B. W., Raub, T. J., Hiebsch, R. R., and Weidman, P. J. (1992). The activity of golgi transport vesicles depends on the presence of the N-Ethylmaleimide-Sensitive factor (NSF) and a soluble NSF attachment protein (aSNAP) during vesicle formation. *J. Cell Biol.* 118, 1321-1332.
- Weidman, P. J., Melancon, P., Block, M. R., and Rothman, J. E. (1989). Binding of an N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein to Golgi membranes requires both a soluble protein(s) and an integral membrane receptor. *J. Cell Biol.* 108, 1589-1596.
- White, J., Helenius, A., and Gething M. J. (1982a) Haemagglutinin of influenza virus expressed from a cloned gene promotes membrane fusion. *Nature* 300, 658-659.
- White, J., Kartenbeck, J., and Helenius, A. (1982b). Membrane fusion activity of influenza virus. *EMBO J.* 1, 217-222.
- White, J. M. (1990). Viral and cellular membrane fusion proteins. *Annu. Rev. Physiol.* 52, 675-697.

- White, J. M. (1992). Membrane fusion. *Science* 258, 917-924.
- Wilschut, J., Duzgunes, N., Fraley, R., and Papahadjopoulos, D. (1980). Studies on the mechanism of membrane fusion: kinetics of calcium ion induced fusion of phosphatidylserine vesicles followed by a new assay for mixing of aqueous vesicle contents. *Biochemistry* 19, 6011-6021.
- Wilson, D. W., Wilcox, C. A., Flynn, G. C., Chen, E., Kuang, W.-J., Henzel, W. J., Block, M. R., Ullrich, A., and Rothman, J. E. (1989). A fusion protein required for vesicle-mediated transport in both mammalian cells and yeast. *Nature* 339, 355-359.
- Wilson, D. W., Whiteheart, S. W., Wiedman, M., Brunner, M., and Rothman, J. E. (1992). A multisubunit particle implicated in membrane fusion. *Cell* 117, 531-538.
- Woodman, P. G., and Edwardson, J. M. (1986). A cell-free assay for the insertion of a viral glycoprotein into the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 103, 1829-1835.
- 小林俊秀 (1992). 細胞とリポソーム. 寺田弘, 吉村哲郎 (編) ライフサイエンスにおけるリポソーム. シュプリンガー・フェアラーク, 東京, pp243-279.
- 下岡尚, 寺田弘 (1992). リポソームのサイズ分布. 寺田弘, 吉村哲郎 (編) ライフサイエンスにおけるリポソーム. シュプリンガー・フェアラーク, 東京, pp97-103.